

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller

---

**Identifizierung des zentralen Polypeptids des generellen  
RNA-Polymerase III Transkriptionsfaktors TFIIIC1**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

dem Fachbereich Humanmedizin der  
Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Christin Gruber**  
aus Freital

Marburg/Lahn 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am: 16.07.2004  
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.  
Dekan: Prof. Dr. B. Maisch  
Referent: Prof. Dr. R. Lührmann  
Korreferent: Prof. Dr. G. Suske

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen</b>	<b>1</b>
1.1.1	Die RNA-Polymerasen I und II	2
1.1.2	Die RNA-Polymerase III	2
<b>1.2</b>	<b>Promotorstrukturen der RNA-Polymerase III-abhängigen Gene</b>	<b>4</b>
1.2.1	"Klassische Gene" mit intern lokalisiertem Promotor	4
1.2.2	Gene mit 5'-lokalisiertem Promotor	6
<b>1.3</b>	<b>Die Transkriptionsfaktoren der RNA Polymerase III-abhängigen Gene</b>	<b>8</b>
1.3.1	TFIIIA	8
1.3.2	TFIIIC	9
1.3.3	TFIIIB	12
1.3.4	TBP und dessen Interaktion mit den verschiedenen TFIIIB related factors	15
1.3.5	PBP / SNAPc / PTF	16
<b>1.4</b>	<b>Der Ablauf eines Pol III-Transkriptionszyklus</b>	<b>17</b>
<b>1.5</b>	<b>Regulation der Polymerase III Transkription</b>	<b>19</b>
<b>1.6</b>	<b>Maus F9 Embryonale Carcinomazellen</b>	<b>20</b>
<b>1.7</b>	<b>Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN:</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Anzucht und Stammhaltung von Bakterien</b>	<b>26</b>
<b>3.2</b>	<b>Arbeiten mit Nukleinsäuren</b>	<b>27</b>
3.2.1	Präparation von Plasmid-DNA (aus E.coli) für analytische Zwecke („Mini-Screen“)	27
3.2.2	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA	27
3.2.3	Standardbedingungen zur Fällung von Nukleinsäuren	28
3.2.4	Bestimmung der Konzentration von Desoxyribonukleinsäuren	28
3.2.5	Spaltung mit Restriktionsenzymen	28
3.2.6	Anfärbung von Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid	29
3.2.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen mittels Elektroelution	29
3.2.8	Transformation	30
3.2.9	Selektion positiver Transformanten	31
3.2.10	PCR	31
3.2.11	Abtrennung nicht-inkorporierter Oligonukleotide von PCR-Produkten	33

<b>3.3</b>	<b>Gelelektrophoretische Methoden</b>	<b>33</b>
3.3.1	Agarosegele	33
3.3.2	Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele	34
3.3.3	Nichtdenaturierende Polyacrylamidgele zur nativen DNA-Auftrennung	34
3.3.4	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (nach Laemmli, 1970)	35
<b>3.4</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>36</b>
3.4.1	Anzucht von Maus F9 Embryonalen Carcinomazellen	36
3.4.1.1	Differenzierung von F9 Embryonalen Carcinomazellen (EC) zu F9 Parietalen Endodermzellen (PE)	37
3.4.2	Anzucht menschlicher Tumorzellen in Suspensionskultur	38
3.4.3	Expression monoklonaler Antikörper	38
<b>3.5</b>	<b>Präparation zellfreier Extrakte</b>	<b>39</b>
3.5.1	Präparation von zytoplasmatischem Extrakt (S100) aus HEK-Zellen, F9 EC- und F9 PE-Zellen (nach Weil et al., 1979)	39
3.5.2	Präparation von Kernextrakt (modifiziert nach Shapiro et al., 1988)	40
<b>3.6</b>	<b>Arbeiten mit Proteinen</b>	<b>41</b>
3.6.1	Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat	41
3.6.2	Proteinkonzentrationsbestimmung durch kolorimetrische Proteinquantifizierung (Bradford, 1976)	41
3.6.3	Dialyse von Proteinlösungen	41
3.6.4	Umpuffern von Proteinlösungen per Gelfiltration	42
3.6.5	Expression und Reinigung rekombinanter Proteine (TBP) aus E. coli	42
3.6.6	Reinigung von monoklonalen Antikörpern aus Hybridoma-Zellüberständen.	44
3.6.7	Reinigung von IgGs aus Kaninchen-Serum	44
3.6.8	Irreversible Immobilisierung von Antikörpern an HiTrap Protein G Säulen	45
3.6.9	Immunodepletion / Immunopräzipitation mittels Säulen-chromatographie	46
3.6.10	Immunodetektion von Proteinen (Western-Blot)	46
3.6.10.1	Transfer elektrophoretisch getrennter Proteine auf PVDF-Transfermembran	47
3.6.10.2	Nachweis spezifischer Proteine durch Antigen-Antikörper-Wechselwirkung	48
3.6.11	Konzentrieren von Proteinlösungen für SDS-Gel-Elektrophorese mit Strataclean™ Resin	49
3.6.12	Anfärben von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue	49
3.6.13	Silberfärbung von Proteingelen nach Blum et al., 1987	50
3.6.14	Anfärben von Proteinen mit SimplyBlue™ SafeStain	50
<b>3.7</b>	<b>Reinigung von Transkriptionsfaktoren des humanen Polymerase III Systems</b>	<b>51</b>
3.7.1	Reinigung von Proteinfractionen über Niederdruck-Chromatographie (Liquid Chromatography, LC), Phosphocellulose	51
3.7.2	Reinigung von Proteinfractionen über Mitteldruck-Chromatographie	51
3.7.2.1	Anionentauscher	52
3.7.2.2	Kationentauscher	52
3.7.2.3	Gelfiltration, „Size Exclusion Chromatography“ (SEC)	53



3.7.2.4	Reinigung von rekombinantem TBP über Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose	53
3.7.2.5	Single stranded DNA-Cellulose (ssDNA-Cellulose)	54
<b>3.7.3</b>	<b>Präparation der Pol III Transkriptionsfaktoren</b>	<b>54</b>
3.7.3.1	Weitere chromatographische Trennung der PCB- und PCC-Fractionen	54
3.7.3.2	Präparation von TFIIB $\beta$ und Polymerase III	55
3.7.3.3	Präparation von TFIIU aus der TFIIC0-Fraktion	57
3.7.3.4	Reinigung von TFIIC1 und TFIIC1like über MonoS	57
3.7.3.5	Weitere Reinigung von TFIIC1 <sub>low</sub> und TFIIC1 <sub>high</sub> über MiniS	59
3.7.3.6	Weitere Reinigung von TFIIC1 <sub>low</sub> und TFIIC1 <sub>high</sub> bzw. von TFIIC1like <sub>low</sub> und TFIIC1like <sub>high</sub> über MiniQ	59
<b>3.8</b>	<b><i>In vitro</i> Transkription</b>	<b>59</b>
3.8.1	Spezifische <i>in vitro</i> Transkription	59
3.8.2	Aufarbeitung von RNA aus <i>in vitro</i> Transkriptionsansätzen	61
<b>3.9</b>	<b>Bestimmung radioaktiver Strahlung</b>	<b>61</b>
3.9.1	qualitativ durch Autoradiographie	61
3.9.2	qualitativ und quantitativ mittels Analyse durch einen Phosphor Imager	62
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchungen zur Funktion von hBdp1</b>	<b>64</b>
4.1.1	Analyse der VAI- und U6 Transkriptionssysteme im Hinblick auf Bdp1	64
4.1.2	Vollständige Trennung von Brf2 und den anti Bdp1 reaktiven Proteinen über Superdex 200 Chromatographie	68
<b>4.2</b>	<b>TFNR ist eine essentielle Komponente der TFIIC1 Aktivität</b>	<b>74</b>
4.2.1	Reinigung von TFIIC1 für eine MALDI TOF Analyse	74
4.2.1.1	Reinigung von TFIIC1 <sub>low</sub> und TFIIC1 <sub>high</sub> über MiniQ Chromatographie	76
4.2.1.2	Reinigung von MiniQ- TFIIC1 <sub>low</sub> und -TFIIC1 <sub>high</sub> über Superdex 200	78
4.2.1.3	Die präparative Superdex 200 Chromatographie führt zur MALDI TOF Analyse potenzieller TFIIC1 Untereinheiten	79
4.2.2	TFNR koeluiert mit den Aktivitäten TFIIC1 <sub>low</sub> und TFIIC1 <sub>high</sub> über MonoS und MiniQ	84
4.2.3	GCN5 ist Bestandteil der MonoS- und MiniQ-TFIIC1 <sub>low</sub> / <sub>high</sub> Fraktionen	87
4.2.4	Die TFNR-Depletion von TFIIC1 Fraktionen führt zum Verlust der TFIIC1-Transkriptionsaktivität <i>in vitro</i>	89
4.2.5	Die anti Bdp1 reaktiven Proteine der TFIIU Fraktion zeigen keine TFIIC1 Aktivität	92
<b>4.3</b>	<b>Die 150-160 kDa Bdp1 Formen repräsentieren die TFIIC1like Aktivität</b>	<b>93</b>
<b>4.4</b>	<b>TFIIC1, TFIIC1like und rekombinantes Bdp1 (TFIIB150) sind funktionell austauschbar</b>	<b>101</b>
<b>4.5</b>	<b>TFIIC1-inaktive Extrakte differenzierter F9 Zellen enthalten kein TFNR</b>	<b>103</b>

---

<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>106</b>
<b>5.1</b>	<b>Die chromatographische Reinigung von TFIIIC1 führt zur MALDI TOF Analyse</b>	<b>107</b>
<b>5.2</b>	<b>Bdp1 ist die zentrale Komponente der Aktivitäten TFIIIC1 und TFIIIC1like</b>	<b>108</b>
5.2.1	Anti Bdp1 reaktive Proteine, die keine Pol III Transkriptionsaktivität zeigen	109
<b>5.3</b>	<b>Die Existenz verschiedener hBdp1-Varianten stellt einen möglichen Regulationsmechanismus dar</b>	<b>110</b>
<b>5.4</b>	<b>Bildet die 250 kDa-Form von hBdp1 (TFNR) möglicherweise einen Komplex mit anderen Proteinen?</b>	<b>111</b>
<b>5.5</b>	<b>Bdp1 stellt den limitierenden Faktor der Pol III Transkription dar</b>	<b>113</b>
<b>5.6</b>	<b>Bdp1 im Vergleich: Hefe-Mensch</b>	<b>115</b>
<b>5.7</b>	<b>Ausblick</b>	<b>117</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>123</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>140</b>
<b>9.1</b>	<b>Akademische Lehrer</b>	<b>140</b>
<b>9.2</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>141</b>
<b>9.3</b>	<b>Danksagung</b>	<b>142</b>
<b>9.4</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>143</b>

## 1 Einleitung

Die menschliche Erbinformation ist größtenteils in den Chromosomen des Zellkerns und zu einem sehr geringen Teil (0,0005%) in den Mitochondrien des Zellplasmas gespeichert. Dabei dient die Desoxyribonukleinsäure (DNS, DNA) als Trägersubstanz dieser genetischen Information. Sie verschlüsselt in einer bestimmten Sequenz der Basen Adenin, Cytosin, Thymin und Guanin den genetischen Code. Als Gen wird derjenige Abschnitt auf der DNA bezeichnet, welcher für ein bestimmtes Produkt kodiert (einschließlich Promotorelemente). Für die Realisierung der Erbsubstanz wird die DNA-Sequenz in Ribonukleinsäure (RNS, RNA)-Moleküle umgeschrieben. Dieser Prozess wird als Transkription bezeichnet, welcher von den DNA-abhängigen RNA-Polymerasen katalysiert wird. Des weiteren werden für die Transkription der verschiedenen Gene zusätzliche Hilfsproteine benötigt, die sogenannten Transkriptionsfaktoren (TF). Der größte Teil der ca. 30.000-40.000 menschlichen Gene (Humanes Genomprojekt) kodiert für Messenger-RNAs (mRNAs), welche ihrerseits als Matrize für die Proteinbiosynthese dienen (Protein-kodierende Gene). Ein geringer Teil der Gene kodiert für kleinere RNA-Moleküle, welche selbst das Endprodukt darstellen und funktionelle Aufgaben in der Zelle übernehmen.

### 1.1 Die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen

Im Gegensatz zu prokaryotischen Zellen, in denen nur eine RNA-Polymerase für die Synthese aller zellulären RNA-Typen verantwortlich ist, teilen sich in eukaryotischen Zellen drei unterschiedliche RNA-Polymerasen die Transkription verschiedener Gen-Klassen. Diese komplexen Enzyme werden als Polymerasen I, II und III bzw. als A, B und C bezeichnet. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber  $\alpha$ -Amanitin, dem Gift des Knollenblätterpilzes (Seifart und Sekeris, 1969; Chambon, 1975). Außerdem sind die drei eukaryotischen RNA-Polymerasen im Zellkern unterschiedlich lokalisiert und differieren in ihrer Matrizenspezifität (Roeder und Rutter, 1969; Seifart et al., 1972; Roeder, 1976).

### **1.1.1 Die RNA-Polymerasen I und II**

Die in den Nucleoli vorkommende RNA-Polymerase I (A) transkribiert nur ein einziges Gen, das 45S-rRNA-Gen, welches als Cluster in sehr hoher Kopienzahl im Genom vorliegt. Aus der entstandenen Vorläufer-RNA werden die reifen, ribosomalen 5,8S-, 18S- und 28S-rRNAs durch endonukleolytische Spaltung und Methylierung prozessiert (Udvardy und Seifart, 1976; Grummt, 1981; Reeder, 1992; Moss und Stefanofsky, 1995). rRNAs stellen strukturelle sowie funktionelle Elemente der Ribosomen, dem Ort der Proteinbiosynthese, dar.

Die RNA-Polymerase II (B) ist in der Kernmatrix lokalisiert und katalysiert die Transkription aller Protein-kodierenden Gene, wobei zuerst heteronukleäre RNAs (hnRNAs) entstehen, welche durch anschließendes Spleißen zu mRNAs prozessiert werden. Diese mRNA-Moleküle werden nachfolgend an den Ribosomen translatiert, wobei die genetische Information in die Aminosäuresequenz der Proteine übertragen wird (Breathnach und Chambon, 1981; Sawadogo und Sentenac, 1990; Conaway und Conaway, 1993; Roeder, 1996; Proudfoot, 2000; Reed, 2000). Außerdem transkribiert die Polymerase II einige kleinere Kern-RNAs, vor allem die Uracil-reichen small nuclear U snRNAs des Spleißapparates, mit Ausnahme der U6 snRNA (Buratowski, 1994; Kunkel et al., 1986; Hernandez, 1992).

### **1.1.2 Die RNA-Polymerase III**

Die RNA-Polymerase III (C), welche ebenfalls in der Kernmatrix lokalisiert ist, transkribiert eine gewisse Anzahl niedermolekularer, nicht Protein-kodierender Gene. Beispielsweise transportieren deren RNA-Produkte als Transfer-RNAs (tRNAs) die Aminosäuren zu den Ribosomen und sind somit an der Proteinbiosynthese beteiligt (Weinmann und Roeder, 1974; Yamamoto et al., 1977). Die U6 snRNA ist ebenfalls ein Polymerase III Produkt und ist an der Prozessierung der hnRNAs nach der Transkription beteiligt (Kunkel, 1991). Außerdem spielen die H1 RNA als Bestandteil der RNase P eine Rolle bei der Prozessierung der tRNAs (Baer et al., 1989) und die 7SL RNA als Bestandteil des Signalerkennungspartikels eine Rolle beim intrazellulären Proteintransport (Walter und Blobel, 1982). Ferner werden von der Polymerase III einige RNAs synthetisiert (die 7SK RNA sowie die als "Pseudogen" vermuteten Alu-

Sequenzen), deren physiologische Funktionen noch nicht geklärt sind (Palmer und Folk, 1990). Des weiteren bedienen sich einige virale Gene der Polymerase III-Maschinerie zur Herstellung ihrer RNAs, zu welchen die VAI- und VAII-Gene des Adenovirus sowie die EBERI- und EBERII-Gene des Epstein-Barr-Virus zählen (Gabrielsen und Sentenac, 1991; Geiduschek und Kassavetis, 1992; Willis, 1993).

Die RNA-Polymerase III (C) der Hefe (yRPC; yPol III), mit einem Gesamt-molekulargewicht von über 650 kDa, besteht aus 17 Untereinheiten von 10-160 kDa, deren Gene alle kloniert werden konnten (Gabrielsen und Sentenac, 1991; Sentenac et al., 1992; Sathale und Woychik, 1994; Ferri et al., 2000). Die beiden größten Untereinheiten der yPol III (yRPC160 und 128) sind mit den beiden größten Untereinheiten der yPol I (yRPA) und yPol II (yRPB) sowie der bakteriellen und Archea Polymerase strukturell und funktionell verwandt (Dieci et al., 1995; Sentenac et al., 1992; Review: Geiduschek und Kassavetis, 2001). Deren Funktionen bestehen in der Nukleotideinbindung sowie der Interaktion der DNA mit der synthetisierten RNA. Fünf der kleineren Untereinheiten sind essentielle Komponenten aller drei Hefe Polymerasen (yRPABC27, 23, 14.5, 10 $\alpha$  und 10 $\beta$ ), welche beispielsweise für deren Lokalisation im Kern sowie für die Effizienz und Regulation der RNA-Synthese verantwortlich sind (Gabrielsen und Sentenac, 1991; Sentenac et al., 1992; Chédin et al., 1998b). Acht weitere kleine Untereinheiten sind spezifische Untereinheiten der yPol III, wobei die Untereinheiten yRPC82, 34 und 31 einen Subkomplex bilden, welcher an der Erkennung des Präinitiationskomplexes beteiligt ist (Werner et al., 1992; Werner et al., 1993; Khoo et al., 1994; Thuillier et al., 1995). Mit der Untereinheit yRPC11 besitzt die yPol III eine intrinsische 3'→5' Korrekturlesefunktion, welche eine wichtige Funktion für die Termination übernimmt (Chédin et al., 1998a).

Im Vergleich zur Hefe Pol III ist die humane Polymerase III (hRPC; hPol III) weniger gut charakterisiert. Sie besteht aus 16 Untereinheiten (Wang und Roeder, 1996; Wang und Roeder, 1997), von denen die hRPC53-Untereinheit (Ittmann et al., 1993) und ein Subkomplex, bestehend aus hRPC62, 39 und 32 (Wang und Roeder, 1997), kloniert werden konnten. Homolog zur Hefe dirigiert dieser Subkomplex die spezifische hPol III Rekrutierung an den Präinitiations-

komplex. (Wang und Roeder, 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung der hRPC53-Untereinheit zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase führt (Ittmann et al., 1987; Ittmann, 1994). Diese Beobachtung konnte auch für die homologe Hefe-Untereinheit gemacht werden (Mann et al., 1992). Die Expression der humanen RPC53-Untereinheit soll über das Onkoprotein c-Myc reguliert werden (Greasley et al., 2000).

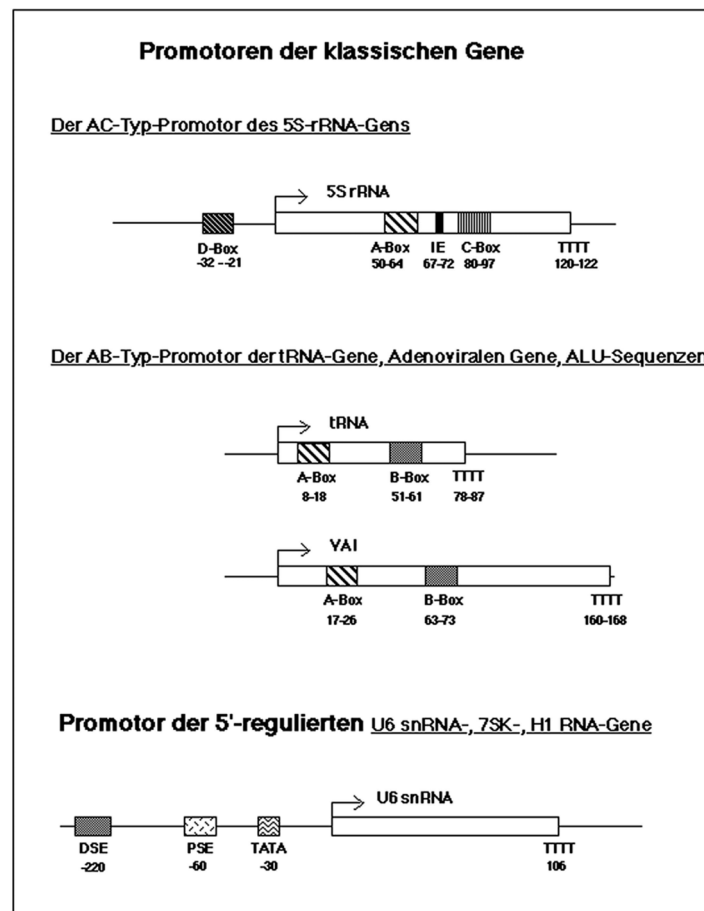
## **1.2 Promotorstrukturen der RNA-Polymerase III-abhängigen Gene**

Die kleinen nicht Protein-kodierenden Gene, welche von der humanen Pol III transkribiert werden, unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Promotortypen:

- in die "klassischen Gene", deren Promotorelemente vollständig im kodierenden Bereich lokalisiert sind (AB-Typ und AC-Typ) und im Gegensatz dazu
- in die 5'-regulierten Gene, deren Promotorelemente upstream (extern) der kodierenden Gensequenz liegen (Übersicht 1).

### **1.2.1 "Klassische Gene" mit intern lokalisiertem Promotor**

Mit Ausnahme des 5S rRNA-Gens besitzen die "klassischen Gene" den intern lokalisierten Promotor vom AB-Typ (Typ 2 Promotor). Hierzu zählen sämtliche tRNA-Gene, die viralen VA- und EBER-Gene, das Gen für die 7SL-RNA sowie die hochrepetitiven Alu-Sequenzen. Das VAI-Gen wird aufgrund der fehlenden Prozessierung der RNA gerne als DNA-Matrize für *in vitro* Experimente herangezogen. Der Promotor der AB-Typ-Gene besteht aus den beiden hochkonservierten Elementen A-Box und B-Box (s. Übersicht 1), wobei die A-Box den exakten Initiationsstartpunkt der Transkription festlegt (Fowlkes und Schenk, 1980; Guilfoyle und Weinmann, 1981; Hofstetter et al., 1981; Rosa et al., 1981; Ciliberto et al., 1983; Geiduschek und Tocchini-Valentini, 1988; Geiduschek und Kassavetis, 1992; Willis, 1993). Der Abstand zwischen diesen Consensus-Sequenzen gilt als sehr variabel, wobei für die tRNA-Gene in der Hefe ein Abstand zwischen 30 und 60 Basenpaaren als optimal angesehen wird (Cannon et al., 1986; Baker et al., 1987; Fabrizio et al., 1987). Funktionell bilden beide Boxen die Bindestellen für den primär DNA-bindenden Faktor yTFIIIC/hTFIIIC2 (Baker et al., 1987; Bartholomew et al., 1990; Geiduschek und Kassavetis, 1992; Oettel et al., 1997).



Übersicht 1: Die verschiedenen Promotorstrukturen der Pol III Gene

Die Ausnahme unter den "klassischen Genen" bildet das 5S rRNA-Gen. Dessen aus drei Elementen bestehender Promotor vom AC-Typ (Typ 1 Promotor) wird auch als Internal Control Region (ICR) bezeichnet und umfasst eine A- und C-Box sowie das dazwischen gelegene Intermediate Element (s. Übersicht 1). Der Abstand zwischen diesen Promotorstrukturen ist für eine effiziente Transkription essentiell und somit im Gegensatz zum AB-Typ kaum variabel (Bogenhagen et al., 1980; Sakonju et al., 1980; Pieler et al., 1985a, 1985b, 1987). Die A-Box enthält sequenzielle Strukturen der tRNA-Box (Typ 2) und ist auch funktionell weitgehend mit jener vergleichbar (Ciliberto et al., 1983). Voraussetzung für die Bildung des Initiationskomplexes am AC-Promotortyp ist die Bindung des genspezifischen Faktors TFIIIA, welche sich über die gesamte ICR erstreckt (Engelke et al., 1980; Miller et al., 1985; Seifart et al., 1989).

Das humane 5S rRNA-Gen besitzt zusätzlich zur ICR eine konservierte Sequenz im 5'-flankierenden Bereich, die als D-Box bezeichnet wird. Obwohl gezeigt werden konnte, dass Mutationen dieser D-Box zu einer massiven Verminderung der Transkriptionseffizienz führen, konnte bisher kein eigenständiger D-Box-spezifischer Faktor nachgewiesen werden (Nielsen et al., 1993; Haertel, 1995; Weser, 2000).

### **1.2.2 Gene mit 5'-lokalisiertem Promotor**

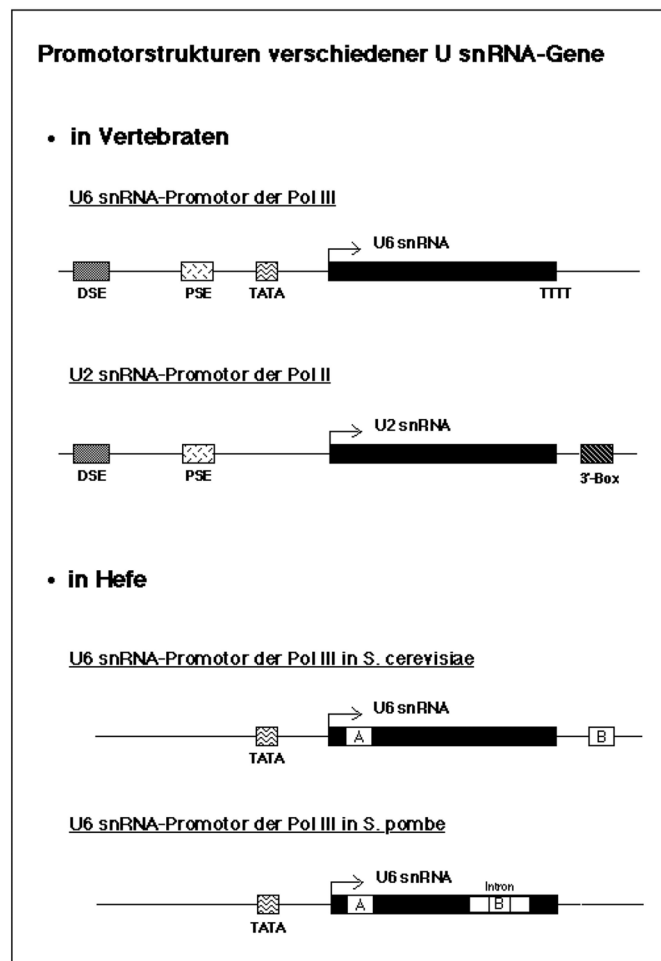
Ein vollständig genextern gelegener Promotor bietet den Vorteil, dass er sich im Laufe der Evolution unabhängig von der Sequenz des Genprodukts verändern kann. Solche 5'-lokalisierten Pol III-Promotoren (Typ 3 Promotor) sind erst in höheren Eukaryoten zu finden, was auf eine relativ späte Entwicklung dieses Promotortyps innerhalb der Evolution hinweist (Willis, 1993; Schramm und Hernandez, 2002). Die 5'-regulierten Pol III-Gene unterscheiden sich nicht nur in ihrer Promotorstruktur von den "klassischen Genen", sondern auch in ihrem Bedarf an Transkriptionsfaktoren. Es handelt sich um verschiedene kleine RNA-Gene, deren Produkte überwiegend an der RNA-Prozessierung mitwirken (Hernandez, 1992). Die Polymerasen II und III teilen sich die Transkription dieser Gene. Zu den Pol III-abhängigen Genen mit externem Promotor zählen das am besten charakterisierte U6 snRNA-Gen, das Pflanzen U3 snRNA-Gen sowie die Gene für die humanen 7SK-, Y1-, Y3- und H1-RNAs (Baer et al., 1989; Kunkel, 1991; Hernandez, 1992).

Stellvertretend für die 5'-lokalisierten Pol III-Promotoren der Vertebraten enthält der U6 snRNA-Promotor ein distales Sequenz-Element (DSE), ein proximales Sequenz-Element (PSE) sowie eine TATA-Box (s. Übersicht 1). Das klassische Regulationsmotiv Pol II-exprimierter Gene, die TATA-Box, ist in den externen Pol III-Promotoren der Vertebraten invers orientiert. Erstaunlicherweise ist gerade diese TATA-Sequenz im U6-Promotor für die Polymerase III-Spezifität dieses Genes verantwortlich (Mattaj, 1988; Lobo und Hernandez, 1989). Zudem soll eine downstream der TATA-Box gelegene Sequenz (BURE, BRFU Recognition Element) der genextern regulierten Promotoren für deren Pol III Spezifität verantwortlich sein (Cabart und Murphy, 2002). Die von der Pol II transkribierten U1-U5 snRNA-Gene (außer U3) enthalten wie das U6 snRNA-Gen die Promotorelemente DSE und PSE, aber keine TATA-Box (Murphy et al.,



1989; s. Übersicht 2). Für das U1 snRNA-Gen konnte gezeigt werden, dass nicht nur das Einfügen einer TATA-Box in den Promotor, sondern auch der Abstand Zwischen TATA-Box und PSE für den Wechsel der Polymerasespezifität von Pol II zu Pol III verantwortlich ist. Somit legen die an das PSE und die TATA-Box-bindenden Proteine gemeinsam die Polymerasespezifität fest (Gabrielsen und Sentenac, 1991). Dabei bindet PBP spezifisch an das Promotorelement PSE (s. 1.3.5, PBP) und TBP (TATA-Box bindendes Protein) erkennt die TATA-Sequenz (s. 1.3.3, TFIIB). Während TATA-Box und PSE die basalen Promotorelemente darstellen, nimmt das weiter upstream gelegene DSE die Funktion eines Enhancers ein, welcher stimulierend auf die Transkription wirkt. Neben einem Octamer-Motiv als Bindungsstelle für den generellen Transkriptionsfaktor Oct-1 enthält das DSE eine weitere Bindungssequenz für den ebenfalls transkriptionsaktivierenden Faktor Sp1 (Courey und Tjian, 1988; Sturm et al., 1988; Hernandez, 1992). Zudem enthält das DSE verschiedener Spezies upstream der Octamer-Sequenz ein Bindungsmotiv (SPH) für den Transaktivator Staf (Schuster et al., 1995; Schaub et al., 1997). Für das Maus U6 snRNA-Gen, welches in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, konnte gezeigt werden, dass das DSE für eine effiziente *in vitro* Transkription nicht erforderlich ist (Waldschmidt et al., 1991).

Der U6 snRNA-Promotor der Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* weist Elemente der "klassischen" sowie der 5'-regulierten Gene auf (s. Übersicht 2). Er beinhaltet eine 5'-gelegene TATA-Box, eine geninterne A-Box sowie eine B-Box, welche bei *S. cerevisiae* downstream des Terminators, bei *S. pombe* genintern in einem Intron lokalisiert ist. Dieser Hybridpromotor enthält jedoch keine der Vertebraten ähnlichen PSE-Sequenz.



Übersicht 2: Vergleich verschiedener U snRNA-Promotoren in Vertebraten und Hefe

### 1.3 Die Transkriptionsfaktoren der RNA Polymerase III-abhängigen Gene

Die ursprüngliche Nomenklatur der Transkriptionsfaktoren entstammt den einzelnen Phosphocellulose (PC)-Fraktionen PCA, PCB, PCC und PCD, die während der chromatographischen Reinigung von cytoplasmatischem Extrakt über PC entstehen (Segall et al., 1980). Die in der PCA-Fraktion enthaltene Aktivität wurde TFIIIA genannt und dementsprechend wurden die Aktivitäten der PCB- und PCC-Fraktionen als TFIIIB und TFIIIC bezeichnet.

#### 1.3.1 TFIIIA

Der erste eukaryotische Transkriptionsfaktor (TF) des Pol III Systems, welcher gereinigt und kloniert werden konnte, war das Zinkfingerprotein *Xenopus laevis* TFIIIA (Engelke et al., 1980; Ginsberg et al., 1984; Miller et al., 1985). Dieser

5S rRNA-Gen spezifische Transkriptionsfaktor bindet über neun Zinkfinger an die interne Kontrollregion (ICR), wobei die drei N-terminalen Zinkfinger die C-Box binden und den größten Anteil der Bindungskapazität ausmachen (Clemens et al., 1992; Foster et al., 1997; Nolte et al., 1998). Dagegen binden die drei C-terminalen Zinkfinger die A-Box (Clemens et al., 1992). Der humane TFIIIA ist ein globuläres, 42 kDa Protein (Waldschmidt et al., 1990) und konnte 1995 kloniert werden (Arakawa et al., 1995; Drew et al., 1995). hTFIIIA bildet über die primäre Bindung an die ICR des AC-Promotortyps die Plattform für die TFIIIC2-Assemblierung in den wachsenden Transkriptionskomplex, wobei die TFIIIC2 Rekrutierung an den Promotor in einer Erweiterung des TFIIIA-Footprints bis zum Startpunkt resultiert (Seifart et al., 1989; Moorefield und Roeder, 1994; Fradkin et al., 1989; Oettel et al., 1997). Funktionell ist hTFIIIA gegen *Xenopus* TFIIIA *in vitro* austauschbar (Moorefield und Roeder, 1994;). Die Homologien zum Hefe ScTFIIIA beschränken sich lediglich auf die Zinkfinger motive (Review: Paule und White, 2000).

### **1.3.2 TFIIIC**

Der Transkriptionsfaktor TFIIIC ist für die Hefe *S. cerevisiae* am besten charakterisiert. Hier wird er auch als Tau ( $\tau$ )-Faktor bezeichnet und ist als primär DNA-bindender Faktor für die Expression aller Hefe Pol III-Gene essentiell. Lediglich am 5S rRNA-Gen bindet er nach der TFIIIA Assemblierung. yTFIIIC ist ein aus sechs Untereinheiten aufgebauter Multiproteinkomplex mit Molekulargewichten von 138, 131, 95, 91, 60 und 55 kDa (Gabrielsen et al., 1989; Schultz et al., 1989; Bartholomew et al., 1990; Parsons und Weil, 1990; Conesa et al., 1993). Alle Untereinheiten konnten kloniert werden (Swanson et al., 1991; Lefebvre et al., 1992; Marck et al., 1993; Parsons und Weil, 1992; Arrebola et al., 1998; Manaud et al., 1998). Strukturell ist yTFIIIC aus zwei großen Bindungsdomänen aufgebaut, die als  $\tau$ A und  $\tau$ B bezeichnet werden (Burnol et al., 1993a; Schultz et al., 1989). Beide Domänen sind über eine flexible "Hinge" (Schanier)-Region miteinander verbunden, welche Protease-sensitiv ist. Chromatographisch ist der Komplex jedoch nicht trennbar (Marzouki et al., 1986). Die DNA-bindenden Untereinheiten beider Domänen sind yTFIIIC138 für  $\tau$ B und yTFIIIC95 für  $\tau$ A, wobei  $\tau$ B starke Interaktionen mit der B-Box zeigt, wodurch die Bindung von  $\tau$ A an die A-Box ermöglicht wird

(Bartholomew et al., 1990). Weiter konnte gezeigt werden, dass die  $\tau$ A-Untereinheit yTFIIIC131 über TPR-Domänen (Tetratrico-Peptid Repeats) mit den yTFIIIB-Komponenten yBrf1 und yBdp1 interagiert und somit für die yTFIIIB Rekrutierung an den Promotor verantwortlich ist (Bartholomew et al., 1991; Kassavetis et al., 1991; Marck et al., 1993; Khoo et al., 1994; Sethy et al., 1995; Chaussivert et al., 1995; R  th et al., 1996; Mior et al., 1997). yTFIIIC ist auch am Promotor des Hefe U6 snRNA-Gens für die korrekte TFIIIB-Einbindung verantwortlich und bestimmt außerdem die Pol III-Spezifität dieses TATA-Box-haltigen Promotors (Whitehall et al., 1995; Roberts et al., 1995).

Im Gegensatz zur Hefe ist die humane PCC-Fraktion durch chromatographische Reinigung (MonoQ) in drei transkriptionsaktive Fraktionen trennbar, welche der Reihenfolge ihrer Elution entsprechend als hTFIIIC0, hTFIIIC1 und hTFIIIC2 bezeichnet werden (Yoshinaga et al., 1987; Dean und Berk, 1987; Oettel et al., 1997). Humaner TFIIIC2 bildet das funktionelle Homolog zum Hefe TFIIIC, wobei hTFIIIC2 nicht für die Transkription der 5'-regulierten Promotoren benötigt wird (Yoshinaga et al., 1987; Dean und Berk, 1987; Fradkin et al., 1989; Lagna et al., 1994; Wang und Roeder, 1996; Oettel et al., 1997). TFIIIC2 bildet einen Multiproteinkomplex aus fünf Untereinheiten mit Molekulargewichten von 220, 110, 102, 90 und 63 kDa (Yoshinaga et al., 1989; Kovelmann und Roeder, 1992), welche alle kloniert werden konnten (L'Etoile et al., 1994; Lagna et al., 1994; Sinn et al., 1995; Hsieh et al., 1999a; Hsieh et al., 1999b). Ebenso wie in der Hefe bindet die größte Untereinheit hTFIIIC220 primär an die B-Box, obwohl keinerlei Sequenzhomologien zu yTFIIIC138 existieren (Lagna et al., 1994; L'Etoile et al., 1994). Dagegen konnten zwischen den Untereinheiten hTFIIIC102 und yTFIIIC131 sowie zwischen den A-Box-bindenden Untereinheiten hTFIIIC63 und yTFIIIC95 Sequenzhomologien festgestellt werden. Da hTFIIIC102 genau wie sein Hefe-Homolog über TPR-Domänen mit der hTFIIIB  -Komponente hBrf1 interagiert, existiert auch eine funktionelle Homologie hinsichtlich der Rekrutierung von hTFIIIB   durch hTFIIIC2 in den wachsenden Transkriptionskomplex "klassischer Gene" (Hsieh et al., 1999a). Zudem interagiert auch hTFIIIC90 mit hBrf1 (Hsieh et al., 1999b). Neben diesen Interaktionen konnten zusätzliche Interaktionen von hTFIIIC63 und 90 mit den hPol III-Untereinheiten hRPC62 und 39 gezeigt werden (Hsieh

et al., 1999a; Hsieh et al., 1999b). Der auffälligste Unterschied von hTFIIIC2 zu yTFIIIC besteht in den drei Untereinheiten hTFIIIC220, 110 und 90, welche Histon Acetyltransferase (HAT)-Aktivität aufweisen (Hsieh et al., 1999b; Kundu et al., 1999).

Im Gegensatz zu hTFIIIC2 stellt hTFIIIC1 einen generell für alle humanen Pol III-Gene essentiell benötigten Transkriptionsfaktor dar, welcher nicht primär an die DNA bindet (Yoshinaga et al., 1987; Yoon et al., 1995; Oettel et al., 1997), jedoch an allen drei Promotortypen die Bindung des jeweiligen primär DNA-bindenden Faktors verstärkt (Wang und Roeder, 1996; Oettel et al., 1997). An "klassischen Genen" wurde zunächst angenommen, dass hTFIIIC1 den hTFIIIC2-Footprint über die A-Box bis zum Initiator erweitert (Yoshinaga et al., 1987; Dean und Berk, 1987). Oettel et al. (1997) konnten jedoch zeigen, dass an tRNA-Genen durch hTFIIIC2 der komplette Schutz alleine erfolgt. Funktionell zeigt hTFIIIC1 eine essentielle Rolle bei der Rekrutierung der Pol III an den Promotor und somit für die Initiation der Transkription (Kober et al., 1998; Wagner, 2002; Weser et al., 2003). Außerdem stellt hTFIIIC1 einen zentralen Angriffspunkt bei der Transkriptionsregulation während des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung dar (Härtel, 1999; Meissner et al., 2002). Bisher ist es nicht gelungen hTFIIIC1 bis zur Homogenität zu reinigen, weshalb er eine noch immer unbekannte Untereinheitenstruktur besitzt. Jedoch konnte mittels Immunodepletion gegen hTFIIIC220 ein Komplex isoliert werden, der als "Holo-TFIIIC" bezeichnet wurde (Wang und Roeder, 1998). Der hTFIIIC1-Anteil in diesem Komplex soll Polypeptide mit Molekulargewichten von 70, 50, 45 und 40 kDa umfassen. Eine Funktion dieser unbekannten Proteine konnte allerdings nie gezeigt werden. Neben hTFIIIC1 sind zwei weitere Aktivitäten, hTFIIIC1' und hTFIIIC1like beschrieben worden, welche funktionell mit hTFIIIC1 austauschbar sind, sich jedoch in ihrem chromatographischen Verhalten unterscheiden (Wang und Roeder, 1996; Oettel et al., 1997). Während hTFIIIC1 und hTFIIIC1like aus einer PCC-Fraktion stammen und über MonoQ-Chromatographie voneinander trennbar sind (Oettel et al., 1997), stellt die hTFIIIC1' Aktivität eine Kreuzkontamination der PCB-Fraktion und der daraus präparierten EDF-hTFIIIB $\beta$  Fraktion dar (Wang und Roeder, 1996; Meissner et al., 2002).

Durch weitere chromatographische Reinigung der hTFIIIC0-Fraktion konnte gezeigt werden, dass diese Fraktion drei verschiedene Transkriptionsfaktoren enthält. Neben dem bereits erwähnten hTFIIIC1like konnte der für 5'-regulierte Gene spezifische Faktor TFIIIU (s. 1.3.3, Brf2) sowie die Terminator bindende Aktivität TBA aus der hTFIIIC0-Fraktion gereinigt werden (Oettel et al., 1997; Oettel et al., 1998). Die Bindung von TBA an die Terminationsregion "klassischer" Pol III-Gene führt zu einem DNase-Schutz in diesem Bereich (Oettel et al., 1998). 2000 konnte TBA kloniert werden, wobei sich herausstellte, dass dieser Faktor zur NF1-Familie gehört und stimulierende Effekte auf die Termination und Reinitiation ausübt (Wang et al., 2000).

### **1.3.3 TFIIIB**

Wie schon TFIIIC ist auch TFIIIB aus *S. cerevisiae* am besten charakterisiert. Hier ist er der generelle Initiationsfaktor aller Pol III-Gene (Kassavetis et al., 1990; 1998). Chromatographisch ist yTFIIIB in die beiden Fraktionen yB' und yB'' trennbar. Die yB'-Fraktion enthält einen stabilen Komplex aus yTBP und dem 70 kDa Protein yBrf1 (yTFIIIB70/PCF4/TDS4/BRF1), wogegen die yB''-Fraktion das 90 kDa Protein yBdp1 (yB''<sub>90</sub>/yB''/yTFIIIB90/Tfc5/TFIIIB double primed) und eventuell die bisher wenig charakterisierte Aktivität yTFIIIE aufweist (Kassavetis et al., 1991, 1992b, 1995; Bartholomew et al., 1991; Huet und Sentenac, 1992; Colbert und Hahn, 1992; López-De-León et al., 1992; Buratowski und Zhou, 1992; Dieci et al., 1993; Huet et al., 1994; RÜth et al., 1996). yTBP, yBrf1 sowie yBdp1 konnten kloniert werden. Aufgrund einer Homologie zum generellen Initiationsfaktor der Polymerase II (TFIIB) zählt yBrf1 zur Familie der TFIIB related factors. Die konservierten Strukturmerkmale innerhalb dieser Protein-Familie äußern sich in einer Zinkfinger-Domäne und einem aus zwei repeats bestehenden core innerhalb des N-Terminus. Zudem interagiert yBrf1 genau wie TFIIB mit yTBP und der entsprechenden Polymerase (Colbert und Hahn, 1992; Khoo et al., 1994; Willis et al., 2002). Im Unterschied zu TFIIB weisen die TFIIB related factors (yBrf1; hBrf1; Archea TFB) zusätzlich konservierte Regionen innerhalb ihres C-terminalen Bereiches auf (Thompson et al., 1994). Der yTBP/yBrf1-Komplex wird über Protein-Protein-Interaktionen mit den primär DNA-gebundenen Faktoren assembliert (Joazeiro et al., 1996; Persinger et al., 1999). Die Bindung von yBdp1 an den yTBP-yBrf1-DNA

Komplex erfolgt über Interaktion mit yBrf1 und resultiert in einem ungewöhnlich stabilen TFIIIB-DNA Komplex (Kassavetis et al., 1990; 1995; Shah et al., 1999). Sowohl yBrf1 wie auch yBdp1 interagieren mit yTFIIIC (s. 1.3.2). Prinzipiell übernimmt yTFIIIB zwei Aufgaben bei der Pol III Transkription: (A) Über Interaktionen von Brf1 mit den Pol III Untereinheiten yRPC17 und 34 ist yTFIIIB für die Rekrutierung der Polymerase an den Promotor verantwortlich (Kassavetis et al., 1990, 1992b; Brun et al., 1997). Während TFIIIA und TFIIIC als Assemblierungsfaktoren gelten, bildet TFIIIB den Initiationsfaktor des Pol III Systems, wobei einmal in den Transkriptionskomplex eingebundener TFIIIB auch nach Ablösung der primär DNA-bindenden Faktoren TFIIIA und TFIIIC eine korrekte Transkriptionsinitiation vermitteln kann (Kassavetis et al., 1990). (B) Zudem übernimmt yTFIIIB eine wichtige Rolle für die Transkriptionsinitiation. Die Polymerase öffnet die DNA zuerst upstream vom Transkriptionsstartpunkt (Bp -9 bis -5) zum "upstream open complex". Für diese Formationsbildung ist yBdp1 verantwortlich. In einem zweiten Schritt wird diese Transkriptionsblase zum "fully open complex" über den Startpunkt hinaus erweitert (Bp -3 bis +7), wofür die Zinkfinger-Domäne von yBrf1 essentiell ist (Kassavetis et al., 1992a; 2001).

Im humanen System spielt der Faktor TFIIIB ebenfalls eine wesentliche Rolle für eine korrekte Transkriptionsinitiation aller Pol III-Gene. Die Situation ist hier jedoch komplexer, da im humanen Pol III System neben den beiden genintern lokalisierten Promotortypen 1 und 2 zusätzlich der genexterne 5'-gelegene Promotortyp 3 existiert (s. 1.2). Analog dazu weist das humane Pol III System zwei unterschiedliche promotorspezifische TFIIIB-Aktivitäten auf. Teichmann und Seifart konnten 1995 die humane PCB-Fraktion in die beiden Aktivitäten TFIIIB $\alpha$  und TFIIIB $\beta$  trennen, wobei TFIIIB $\alpha$  die spezifische Aktivität für die 5'-regulierten Gene und TFIIIB $\beta$  jene für die "klassischen Gene" darstellen (Teichmann und Seifart, 1995). Die TFIIIB $\beta$ -Fraktion enthält den physisch stabilen hTBP/hBrf1-Komplex, welcher zu jenem aus der Hefe B'-Fraktion homolog ist (Lobo et al., 1992; Teichmann und Seifart, 1995; Wang und Roeder, 1995; Mital et al., 1996). hBrf1 (hTFIIIB90/hBRF/TAF90) zeigt deutliche Homologie zu yBrf1, vor allem im TFIIIB-ähnlichen N-terminalen Bereich (Wang und Roeder, 1995), weshalb auch im humanen System die Bezeichnung TFIIIB

related factor 1 eingeführt worden ist (Willis et al., 2002). Der hTBP/hBrf1-Komplex wird vergleichbar zur Hefe über Interaktionen mit den hTFIIIC2-Untereinheiten hTFIIIC102 und 90 an den TATA-Box-freien Promotor rekrutiert (Hsieh et al., 1999a; 1999b). TFIIIB $\beta$  ist genau wie yTFIIIB über Interaktion von hBrf1 mit der Pol III-Untereinheit hRPC39 für die Rekrutierung der Polymerase an den Promotor verantwortlich (Wang und Roeder, 1997). Die TFIIIB $\alpha$ -Aktivität repräsentiert keinen physisch stabilen TBP-Komplex (Teichmann und Seifart, 1995). Die Assemblierung der TFIIIB $\alpha$ -Aktivität an den 5'-gelegenen Promotor erfolgt eher schrittweise. Nachdem PBP/PTF/SNAPc (s. 1.3.5) primär an die DNA assembliert ist, bindet freies hTBP an die TATA-Box und anschließend wird das 50 kDa Protein hBrf2 über Interaktion mit hTBP rekrutiert (Cabart und Murphy, 2001). hBrf2 (BRFU/TFIIIB50) ist für die Typ 3-Promotorspezifität der TFIIIB $\alpha$ -Aktivität verantwortlich und zeigt ebenfalls durch eine N-terminale Zinkfingerdomäne und den zwei repeats Homologien zu hBrf1 sowie TFIIIB, weshalb auch dieser Faktor zur Familie der TFIIIB related factors zählt (Schramm et al., 2000; Teichmann et al., 2000; Willis et al., 2002). Im Unterschied zu hBrf1 weist hBrf2 jedoch keine konservierten Regionen im C-Terminus auf und ist somit hTFIIIB ähnlicher als hBrf1 (Zhao et al., 2003). Die aus der TFIIIC0-Fraktion gereinigte Aktivität TFIIIU (s. 1.3.2), welche für die Transkription von 5'-regulierten Pol III Genen spezifisch ist (Oettel et al., 1997; 1998), stellt die TFIIIB $\alpha$ -spezifische Komponente hBrf2 dar (Gruber, 2000).

Basierend auf der yBdp1-Sequenz konnte 2000 mittels einer Durchsuchung der humanen und Maus EST-Datenbank und anschließender PCR-Analyse verschiedener humaner cDNA-Bibliotheken ein 150-160 kDa Protein detektiert werden, welches als humanes Bdp1-Homolog beschrieben wurde (Schramm et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass hBdp1 (hB''/hTFIIIB150) für die Transkription aller Pol III-Gene essentiell benötigt wird, da hBdp1-depletierte Zellextrakte für die Pol III Transkription inaktiv waren und die Zugabe des rekombinanten Proteins die Extrakte wieder stimulieren konnte (Schramm et al., 2000; Teichmann et al., 2000; Willis et al., 2002). Aufgrund der N-terminalen Homologie zu yBdp1 wurde das humane Protein analog zur TFIIIB-Situation in der Hefe den beiden humanen Aktivitäten TFIIIB $\alpha$  und TFIIIB $\beta$  zugeordnet (Schramm et al., 2000; Teichmann et al., 2000).



#### **1.3.4 TBP und dessen Interaktion mit den verschiedenen TFIIB related factors**

Das ursprünglich als Pol II-Faktor beschriebene TATA-Box-bindende Protein TBP ist ein genereller Transkriptionsfaktor aller drei RNA-Polymerasen, wobei TBP auch bei der Transkription TATA-Box-loser Promotoren über Protein-Protein-Wechselwirkung eine wesentliche Rolle spielt (Lobo et al., 1992; Comai et al., 1992; Cormack und Struhl, 1992; Schultz et al., 1992; White und Jackson, 1992a; 1992b; Sharp, 1992; Hernandez, 1993).

TBP ist aus verschiedenen Organismen isoliert worden, wobei immer zwei funktionell getrennte Bereiche beobachtet werden konnten. Im nicht-konservierten N-terminalen Bereich unterscheiden sich die TBPs verschiedener Organismen in ihrer Länge (von 18 Aminosäuren bei Pflanzen bis zu 158 beim Menschen) und Sequenz. Dagegen ist der ca. 180 Aminosäuren umfassende C-Terminus hochkonserviert, weshalb er auch als TBP-core bezeichnet wird. Dieser an die TATA-Box-bindende Bereich des Proteins kommt in ähnlicher Form in allen bis dato klonierten TBPs vor (Juo et al., 1996; Kim et al., 1993a, 1993b; Nikolov et al., 1992, 1996). Strukturell ist der C-Terminus aus zwei Wiederholungsmotiven (repeats) aufgebaut, welche symmetrisch sind. Jedes repeat besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices (H1, H2 für repeat 1 und H1', H2' für repeat 2) und fünf kurzen antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern (Lee et al., 1991; Horikoshi et al., 1992; Kim et al., 1993b; Hernandez, 1993).

Da TBP für die Transkription aller Pol III-Gene essentiell ist, muß es mit den entsprechenden Transkriptionsfaktoren der unterschiedlichen Polymerasesysteme sehr spezifisch interagieren. Mit Hilfe von hTBP-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die  $\alpha$ -Helix H1' des zweiten hTBP-repeats sowohl in die Pol II- wie auch in die Pol III-Transkription an TATA-Box-haltigen Promotoren involviert ist. So interagieren hTFIIB (Pol II) und hBrf2 (Pol III) auf eine sehr ähnliche, aber nicht identische Art und Weise mit dem hTBP-DNA-Komplex (Zhao et al., 2003). TFIIB benötigt für die TBP-Interaktion beide repeats innerhalb seines core-Bereiches, hBrf2 dagegen lediglich repeat 2 (Hisatake et al., 1993; Cabart und Murphy, 2001; Zhao et al., 2003). Im Gegensatz dazu wurde für die TBP-Brf1-Interaktion beschrieben, dass sowohl in der Hefe wie auch im humanen System der zweite TBP-repeat nicht für die Interaktion mit Brf1

benötigt wird. Für die Transkription Brf1-abhängiger Pol III Promotoren wird der erste TBP-repeat verantwortlich gemacht (Huet et al., 1994; Joazeiro et al., 1994; Colbert et al., 1998; Shen et al., 1998; Zhao et al., 2003). In die humane Pol III Transkription sind also zwei verschiedene TFIIB related factors involviert, die auf unterschiedliche Art und Weise mit TBP interagieren, wodurch die Transkription entweder an den TATA-Box-haltigen (Typ 3) oder den TATA-Box-losten (Typ 1 und 2) Promotor dirigiert wird. Die Stabilität des physischen TBP/Brf1-Komplexes soll die Interaktion der konservierten C-terminalen Region II von Brf1 mit dem nichtkonservierten TBP-N-Terminus ausmachen (Schröder et al., 2003).

### **1.3.5 PBP / SNAPc / PTF**

Den primär DNA-bindenden Faktor der 5'-lokalisierten Promotoren bildet PBP (Proximales Sequenz Element-bindendes Protein; Waldschmidt et al., 1991). Andere Arbeitsgruppen bezeichneten den Faktor als PTF (PSE-bindender Transkriptionsfaktor; Murphy et al., 1992) sowie SNAPc (snRNA Activating Protein complex; Sadowski et al., 1993). In der Hefe existiert kein PSE-Promotorelement und zudem wurde kein PBP-Homolog beschrieben. Humanes PBP hat zum Maus PSE eine höhere Bindungsaffinität als zum menschlichen PSE. Dies wirkt sich auch in einer höheren Transkriptionseffizienz des Maus U6-Gens aus (Waldschmidt et al., 1991; Simmen et al., 1992). Dabei stellt die Bindung von PBP an die DNA den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt innerhalb eines *in vitro* Transkriptionszyklus dar (Wanandi et al., 1993).

PBP/PTF/SNAPc ist ein aus fünf Untereinheiten bestehender Mutiproteinkomplex mit Molekulargewichten von 19, 43, 45, 50 und 190 kDa, deren Gene alle kloniert werden konnten (Sadowski et al., 1993; Henry et al., 1995; Yoon et al., 1995; Henry et al., 1996; Sadowski et al., 1996; Yoon und Roeder, 1996; Bai et al., 1996; Wong et al., 1998; Henry et al., 1998a). Rekombinantes PBP/PTF/SNAPc aus den genannten fünf Untereinheiten ist in der Lage, an das PSE-Element des Pol II- wie auch des Pol III-snRNA-Promotors zu binden und ist somit für die Ausbildung des Initiationskomplexes beider Polymerasesysteme verantwortlich (Murphy et al., 1992; Henry et al., 1998b). Die DNA-bindenden Untereinheiten sind SNAP190 und SNAP50. Zudem konnte gezeigt werden, dass SNAP190 ein direktes Ziel für den generellen Aktivierungsfaktor

Oct-1 darstellt, welcher kooperativ mit PBP/PTF/SNAPc an die DNA bindet, wobei Oct-1 an die Octamersequenz des Enhancers (Pol II snRNA-Promotor) bzw. des DSE (Pol III snRNA-Promotor) bindet. Dabei führt die Interaktion zwischen der POU-Domäne von Oct-1 und einer 40 Aminosäure-langen Region am SNAP190-C-Terminus zur korrekten PBP/PTF/SNAPc-Rekrutierung an die PSE-Sequenz und letztendlich auch zur Transkriptionssteigerung (Herr et al., 1988; Mittal et al., 1996; Ford et al., 1998; Henry et al., 1998a). Außerdem konnte durch Charakterisierung verschiedener PBP/PTF/SNAPc-Untereinheiten gezeigt werden, dass ein "Mini-Komplex", bestehend aus dem N-terminalen Bereich von SNAP190, SNAP43 sowie SNAP50, ohne Kooperation mit Oct-1 spezifisch an die PSE-Sequenz bindet. Diese DNA-Bindung ist genauso effizient, wie die durch Oct-1-Rekrutierung verursachte PBP/PTF/SNAPc-PSE-Bindung und vermittelt die gleiche transkriptionsstimulierende Wirkung. Dieser "Mini-Komplex" ist zugleich für die kooperative TBP Rekrutierung an die TATA-Box verantwortlich (Mittal et al., 1999).

#### **1.4 Der Ablauf eines Pol III-Transkriptionszyklus**

Der Aufbau des Transkriptionskomplexes beginnt mit der Anlagerung eines primär DNA-bindenden Transkriptionsfaktors an eine für diesen spezifische Erkennungssequenz. So stellen PBP/PTF/SNAPc den primär bindenden Faktor für die 5'-regulierten Gene dar (Typ 3), TFIIC2 für die klassischen AB-Typ-Gene (Typ 2) sowie TFIIIA für das 5S-rRNA-Gen (Typ 1). Anschließend erfolgt die sequenzielle Anlagerung aller weiteren Transkriptionsfaktoren, was in der Rekrutierung der Polymerase an den Initiationskomplex resultiert. Beispielsweise sind für die Bindung des hTBP/hBrf1-Komplexes der klassischen Gene an den Initiationskomplex Interaktionen zwischen hTFIIC102, hTFIIC63, hTBP und hBrf1 verantwortlich. Außerdem interagieren hTFIIC102 mit hTBP sowie hTFIIC90 mit hBrf1 (Hsieh et al., 1999a; Hsieh et al., 1999b). Für das 5S rRNA-Gen konnte gezeigt werden, dass nachdem hTFIIIA, hTFIIC2 und der hTBP/hBrf1-Komplex am Promotor assembliert sind, hTFIIC1 in den Komplex gebunden wird, wodurch anschließend die Polymerase rekrutiert werden kann (Weser et al., 2003). Am 5'-gelegenen U6 snRNA-Promotor wird hTBP über kooperative Bindung mit SNAP190 an die TATA-Box angelagert (Mittal et al.,

1999; Ma und Hernandez, 2002). hBrf2 kann anschließend über hTBP rekrutiert werden (Cabart und Murphy, 2001; Zhao et al., 2003).

Im Gegensatz zur Hefe scheint im humanen System die Rekrutierung der Polymerase durch TFIIIB alleine nicht auszureichen (Wang und Roeder, 1997; Kober et al., 1998). Neben Interaktionen zwischen hTBP und hBrf1 mit der Pol III-Untereinheit hRPC39 des Subkomplexes hRPC62-39-32 (Wang und Roeder, 1997), bestehen zusätzliche Bindungen zwischen den hTFIIIC2-Untereinheiten hTFIIIC63 und hTFIIIC90 mit den hRPC62- und hRPC39-Untereinheiten des bereits genannten Pol III-Subkomplexes (Hsieh et al., 1999a; 1999b).

Nach vollständiger Assemblierung des Transkriptionskomplexes am Promotor erfolgt das Aufschmelzen des geschlossenen Protein-DNA-Komplexes (binärer Komplex), indem der DNA-Doppelstrang durch die Polymerase am Startpunkt geöffnet wird und reversibel der sogenannte "open complex" entsteht. In der Hefe spielen yBrf1 wie auch yBdp1 eine wesentliche Rolle bei der "open complex"-Formation (Kassavetis et al., 2001). Nun erfolgt die Verknüpfung der ersten beiden Ribonukleotide mittels Phosphodiesterbindung (Initiation), wodurch der "open complex" in einen irreversiblen Protein-DNA-RNA-Komplex übergeht (Kassavetis et al., 1992b). Die anschließende Verlängerung der RNA-Kette wird als Elongation bezeichnet, welche den zweiten Schritt innerhalb eines Transkriptionszyklus darstellt. Die Elongation verläuft nicht in gleichmäßigem Tempo, sondern wird durch sogenannte "pausing sites" unterbrochen (Matsuzaki et al., 1994). Diese Pausierungen dienen zum einen der Geschwindigkeitskontrolle der RNA-Synthese, zum anderen dienen sie der Polymerase zur besseren Erkennung der Terminationssequenz (Shaaban et al., 1996; Bobkova und Hall, 1997; Chedin et al., 1998b). In der Hefe umfasst eine Terminationssequenz eine Abfolge von mindestens fünf Thyminresten im nicht-kodierenden Strang, bei Vertebraten reichen vier Thyminreste aus (Geiduschek und Tocchini-Valentini, 1988; Maraia et al., 1992; Review: Huang und Maraia, 2001). Dabei bestimmt die Anzahl der Thyminreste die Stärke des Terminators. Nachdem die Polymerase die Terminatorsequenz erkannt hat, wird die synthetisierte RNA-Kette aus dem Protein-DNA-RNA-Komplex entlassen (Campbell und Setzer, 1992). Für die "klassischen" Pol III-Gene wurde beschrieben, dass die Polymerase nach der Termination ein zweites Mal an den Initiator rekrutiert.

Dieser Schritt wird als Reinitiation oder “multiple round“-Transkription bezeichnet und unterscheidet sich von der primären Initiation, indem die Transkriptionskomplex-Assemblierung bereits erfolgt ist. Das heißt, der ursprüngliche Präinitiationskomplex der ersten Transkriptionsrunde bleibt für mehrere Zyklen erhalten, wobei unklar ist, ob alle Transkriptionsfaktoren an der DNA verbleiben. Vermutlich bleibt TFIIIB am Promotor gebunden (Kassavetis et al., 1990; Weser, 2000). Außerdem wurde für die Hefe gezeigt, dass die Polymerase nach Beendigung des vorangegangenen Zyklus zum gleichen Präinitiationskomplex zurückkehrt und nicht auf einen anderen überwechselt (Dieci und Sentenac, 1996). Höchstwahrscheinlich sind die über hundert Reinitiationsvorgänge an ein und demselben Transkriptionskomplex pro Stunde für die außerordentliche Syntheseleistung der Polymerase III in Eukaryoten verantwortlich (Kovellmann und Roeder, 1990; Dieci und Sentenac, 1996).

### **1.5 Regulation der Polymerase III Transkription**

Die meisten RNA-Produkte der Pol III Transkription sind Komponenten des Translationsapparates, weshalb die Expressionsrate der Pol III Transkription sehr eng mit dem Wachstum einer Zelle verbunden ist und dementsprechend kontrolliert werden muss. So sind die Metazoen-spezifischen Tumorsuppressorproteine Rb (Retinoblastoma-Protein), p53, p104, p107 und p130 Repressoren der Pol III Transkription. Hypophosphorylierte Formen von Rb und der Rb-related “pocket“ Proteine (p104, p107, p130) wurden alle als hBrl1-bindend beschrieben, wodurch die Pol III Transkription zum einen durch die Hemmung der hBrl1-hTFIIIC2-Interaktion und zum anderen durch die Hemmung der hBrl1-Pol III-Interaktion reprimiert wird (Chu et al., 1997; Cairns und White, 1998; Sutcliffe et al., 1999; 2000). Zudem soll Rb mit den beiden SNAPc-Untereinheiten SNAP50 und SNAP43 interagieren, was eine Inhibierung der 5'-regulierten Pol III Transkription zur Folge hat (Hirsch et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Hefe-Protein Maf1p über direkte Bindung der Polymerase III deren Rekrutierung zum Promotor hemmt (Pluta et al., 2001). Auch im humanen System ist der Pol III-Repressor Maf1 konserviert und spielt auf bisher noch unbekannte Weise eine wesentliche Rolle in verschiedenen “Path-

ways“, welche zur Inhibierung der Pol III Transkription führen (Upadhyya et al., 2002).

Neben Repressoren konnte eine Reihe von Aktivatoren der Pol III Transkription gefunden werden. Beispielsweise bindet in Wachstums-arretierten Fibroblasten die MAP-Kinase ERK an hBrf1 und phosphoryliert es zugleich. Phosphoryliertes hBrf1 ist nun in diesen Zellen in der Lage mit hTFIIIC2 und der hPol III zu interagieren, was die Pol III Transkription ermöglicht (Felton-Edkins et al., 2003). Zudem werden auch der Proteinkinase CK2 und dem Onkogenprodukt c-Myc transkriptionsstimulierende Effekte zugesprochen (Johnston et al., 2002; Hu et al., 2003; Gomez-Roman et al., 2003).

## **1.6 Maus F9 Embryonale Carcinomazellen**

Die Embryonale Carcinomazelllinie (EC-Zelllinie) ist durch die Isolierung von malignen Zellen aus einer Primärkultur eines Testicularteratoms der Maus entstanden. Diese Zellen sind in der Lage spontan oder mittels Induktion zu Zellen der drei Keimblätter zu differenzieren, wodurch der maligne Zustand verloren geht (Silver et al., 1983). Abhängig von der Differenzierungsmöglichkeit spricht man entweder von pluripotenten Zellen, die spontan zu verschiedenen Zellen differenzieren können (Review: Aburzua und Sherman, 1990), oder von nullipotenten Zellen, welche die Fähigkeit zur spontanen Differenzierung verloren haben (Strickland und Mahdavi, 1978). In der vorliegenden Arbeit wurden nullipotente F9 EC-Zellen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* Versuche mit Retinsäure zur Ausdifferenzierung von bipotenten Zellen führen, welche Ähnlichkeiten mit extraembryonischen Zellen aufweisen (Strickland und Mahdavi, 1978). In Monolayerkultur und zusätzlicher cAMP-Behandlung entstehen aus diesen Zellen Parietale Endodermzellen (PE-Zellen; Strickland et al., 1980). Die Retinsäure-Behandlung führt hier zu einer Wachstumsinhibierung, die durch cAMP verstärkt wird (Ludwig et al., 1980). Eine alleinige cAMP-Behandlung führt weder eine Differenzierung noch eine Wachstums- hemmung mit sich (Darrow et al., 1990). Prinzipiell sind F9 EC-Zellen den Stammzellen eines frühen Mäuseembryos ähnlich. Ihre Differenzierung ist daher mit der Embryodifferenzierung der Maus vergleichbar (Strickland et al., 1981). Daher eigneten sich diese Zellen in der vorliegenden Arbeit für die

Untersuchung hinsichtlich der Inaktivierung der Pol III Transkription während der Zelldifferenzierung.

### **1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Bisher ist es nicht gelungen die Untereinheiten des generellen RNA-Polymerase III Transkriptionsfaktors TFIIC1 zu identifizieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein chromatographisches Verfahren zu erstellen, welches die präparative Reinigung von TFIIC1 ermöglicht. Im weiteren sollte die MALDI TOF Analyse von Polypeptiden einer gereinigten TFIIC1 Fraktion herangezogen werden. Die Ergebnisse der MALDI TOF Analyse sollten anschließend den Ausgangspunkt für die Identifizierung derjenigen Polypeptide bilden, welche für die Transkriptionsaktivität von TFIIC1 verantwortlich sind.

Des weiteren sollten in dieser Arbeit die einzelnen gereinigten Fraktionen des rekonstituierten U6-Transkriptionssystems auf den Gehalt des Transkriptionsfaktors hTFIIB double prime (hBdp1) untersucht werden, um nachfolgend die Funktion dieses 150-160 kDa Proteins beim Aufbau der verschiedenen Pol III Transkriptionskomplexe analysieren zu können.

## 2 Material

### Radioaktive Nukleotide:

( $\alpha$ - <sup>32</sup> P)GTP (3000 Ci/mmol)	Hartmann, Braunschweig
---	------------------------

### Unmarkierte Nukleotide:

Desoxy-/Ribonukleosidtriphosphate	Roche, Mannheim
-----------------------------------	-----------------

### Enzyme, Antikörper und Inhibitoren:

#### *DNA-modifizierende Enzyme:*

Restriktionsendonukleasen (jeweils mit geeignetem Puffer):	Roche, Mannheim; Biolabs, Schwalbach
T4-Polynukleotidkinase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)	Roche, Mannheim

#### *Sonstige Enzyme:*

Lysozym	Roche, Mannheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNAse A	Roche, Mannheim
Taq-Polymerase	Sigma Aldrich, Deisenhofen

#### *Antikörper:*

anti-mouse-Ig, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt	Amersham Biosciences, Freiburg
anti-rabbit-Ig, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt	Amersham Biosciences, Freiburg
anti-mouse-Ig, <sup>125</sup> I markiert (21,3 µCi/µg)	Amersham Biosciences, Freiburg
anti-rabbit-Ig, <sup>125</sup> I markiert (21,3 µCi/µg)	Amersham Biosciences, Freiburg
anti-hTBP-Ig (monoklonal aus Maus)	Institutseigene Zelllinie
anti-hBrf1-Ig (polyklonal aus Kaninchen)	Wang und Roeder, 1995
anti-hBrf2-Ig (polyklonal aus Kaninchen)	Teichmann et al., 2000
anti-hBdp1-Ig (polyklonal aus Kaninchen)	gerichtet gegen AS 211-357

#### *Inhibitoren:*

Heparin, Natriumsalz	Sigma Aldrich, Deisenhofen
$\alpha$ -Amanitin	Roche, Mannheim
Prime RNAse Inhibitor™	Eppendorf, Hamburg



**Kits:**

ECL Western Blotting detection reagent	Amersham Biosciences, Freiburg
StrataPrep PCR (PCR Purification Kit)	Stratagene, La Jolla, USA
Strataclean™ Resin Silicia Partikel	Stratagene, La Jolla, USA
Endo Free Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Simply Blue™ SafeStain Kit	Invitrogen

**Marker:**

pBR 322 DNA-MspI Digest	Biolabs, Schwalbach
Proteinmarker (Mark 12 MW Standard)	Novex, San Diego
SeeBlue™plus2 (Prestained Standard)	Novex, San Diego

**Gelelektrophoretische Materialien:**

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chlorophorm	Baker, Deventor
Dichlorodimethylsilan	Fluka, Buds (Schweiz)
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	Fluka, Buds (Schweiz)
Harnstoff	Gerbü, Gaiberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
N,N,-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethylenamid (TEMED)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Xylen Cyanol FF	Serva, Heidelberg

**Chromatographie-Medien:**

Ni <sup>2+</sup> -NTA Agarose	Quiagen, Düsseldorf
Phosphocellulose P 11	Whatman, London
EMD-DEAE Fractogel 650S (EDF)	Merck, Darmstadt
EMD-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Fractogel 650S (ESF)	Merck, Darmstadt
MonoQ HR 5/5 und HR 10/10	Amersham Biosciences, Freiburg
MonoS HR 5/5	Amersham Biosciences, Freiburg
MiniQ 4.6/50 PE	Amersham Biosciences, Freiburg
MiniS 4.6/50 PE	Amersham Biosciences, Freiburg
Superdex 200 HR 10/30 und XK 16/70	Amersham Biosciences, Freiburg
Sephadex G25 XK 26/10	Amersham Biosciences, Freiburg
Sephacryl 400 und 500 HR 10/30	Amersham Biosciences, Freiburg
HiTrap™ ProteinG HP (1 ml)	Amersham Biosciences, Freiburg
Single stranded DNA-Cellulose	Sigma Aldrich, Deisenhofen

**Reagenzien für mikrobiologische Arbeiten:**

Agar	Life Technologies, Paisley, UK
Agarose	Eurogentec, Borken
Ampicillin (Ratio®)	Ratiopharm, Ulm
Bacto-Trypton	Life Technologies, Paisley, UK
Hefeextrakt	Life Technologies, Paisley, UK
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	Life Technologies, Paisley, UK
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal)	Roche, Mannheim

**Sonstige Materialien und Substanzen:**

Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Dialysierschlauch	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu, Gaiberg
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Gerbu, Gaiberg
Filterpapier 17CHR	Whatman, London
Glykogen	Fermentag, Littauen
Imaging Plate BAS-MP 2040	Fuji, Kanagawa, Japan
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Mikrokollodiumhülsen	Sartorius, Göttingen
Mikrospin-Säule Mobicol	MoBiTec, Göttingen
Milchpulver	Gifco, Detroit
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Gerbu, Gaiberg
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Phenol	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Polaroid-Film Polapan 57	Polaroid, Frankfurt
Ponceau S	Serva, Heidelberg
Protein dye concentrate (Bradford)	Biorad, München
Rinderserumalbumin (BSA)	Boehringer Mannheim
Standard-Proteingemisch für Gelfiltration	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Transfermembran Immobilon P (PVDF)	Millipore, Bedford, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt
Verstärkerfolie (Intensifying Screen)	Du Pont, Nemours
X-Omat UV Film	Eastman-Kodak, Rochester

alle anderen nicht aufgeführten Chemikalien stammen von: Merck, Darmstadt

**Zellkultur:**

HEK-Tumorzelllinie	Institutseigene Linie
HeLa-Tumorzelllinie	Institutseigene Linie
Hybridoma-Zelllinie anti-hTBP (Mab-TBP)	Institutseigene Linie

**Zellkulturmaterialien:**

"Minimum Essential" Medium (S-MEM)	Life Technologies, Paisley, UK
Hybridoma-Medium	Life Technologies, Paisley, UK
"New born" Kälberserum	Life Technologies, Paisley, UK
Fätales Kälberserum	Life Technologies, Paisley, UK
Streptomycinsulfat	Serva, Heidelberg
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Life Technologies, Paisley, UK
L-Glutamin	Biochrom

**Bakterienstämme:**

<i>E.coli</i> XL1-Blue	Institutseigener Stamm
------------------------	------------------------

**Rekombinantes hBdp1:**

Rekombinantes hBdp1 (TFIIB150, Teichmann et al., 2000) wurde in einem Bacculoviralen System hergestellt (wie in Wang und Roeder, 1995 für rBrf1 beschrieben) und unserem Labor freundlicherweise von M. Teichmann zur Verfügung gestellt.

**Verwendete Plasmide und andere Desoxynukleinsäuren:**

**pUVAI** trägt das aus pVA über Sall/AluI-Restriktion gewonnene VAI-Gen in der HincII-Stelle von pUC 18 (Schneider et al., 1989).

**PUmU6<sub>0.34</sub>** trägt das aus pMU6-52 BE (Oshima et al., 1981) über AluI-Restriktion gewonnene U6 snRNA-Gen der Maus, welches in die HincII-Stelle von pUC 18 kloniert wurde (Waldschmidt et al., 1991).

<b>pUC 9, pUC 18</b>	Institutseigene Plasmide
----------------------	--------------------------

**Oligonukleotide (Primer):**

M13 sequencing Primer (17mer):

5'-gtaaacgacgccagct-3'

M13 reversed sequencing Primer (17mer)

5'-caggaaacagctatgac-3'

M13 sequencing Primer (24mer)

5'-cgccagggtttccagtcacgac-3'

M13 reversed sequencing Primer (24mer)

5'-agcgataacaatttcacacagga-3'

### 3 Methoden:

Vorbemerkung: Die im Folgenden aufgeführten Lösungen wurden, wenn nicht gesondert angegeben, in Reinstwasser einer Christ Labostil-Anlage angesetzt (Aqua bidest)

#### 3.1 Anzucht und Stammhaltung von Bakterien

##### Materialien:

L-Broth Medium:	5g NaCl; 5g Hefeextrakt; 10g Trypton, ad 1000ml A. bid.
TB-Medium:	4ml 100% Glyzerin; 2,31g $\text{KH}_2\text{O}_4$ ; 12,5g $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , ad 1000ml A. bid.
Glyzerin:	87%
Ampicillin:	100 mg/ml

##### Durchführung:

Alle Arbeiten mit Bakterien wurden mit autoklaviertem Material unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Stammhaltung von *Escherichia coli* (*E.coli*) Zellen erfolgte in L-Broth-Glyzerinkulturen. Dabei wurde ein VT (Volumenteil) einer exponentiell wachsenden LB-Flüssigkultur mit einem VT 87% Glyzerin versetzt. Die Kulturen konnten dann bis zu sechs Monate bei -20°C aufbewahrt werden. Nach Ablauf dieser Zeit wurde jeweils ein Aliquot einer solchen Kultur mit einer angeglühten Platinöse auf L-Broth-Agarplatten (1,5% (w/v) Agar) ausgestrichen. Ausgehend von einer der nach vierundzwanzig Stunden bei 37°C gewachsenen Kolonien wurde dann wie oben dargestellt eine frische Glyzerinkultur angelegt.

Die Anzucht der Bakterien wurde entweder in L-Broth-Medium (für analytische Zwecke) oder in TB-Medium (zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA) durchgeführt. Die jeweils angeimpften Medien enthielten 100 µg/ml Ampicillin und wurden bei 37°C auf dem Schüttler (250 UpM) inkubiert.

### 3.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### 3.2.1 *Präparation von Plasmid-DNA (aus E.coli) für analytische Zwecke („Mini-Screen“)*

##### **Materialien:**

L-Broth Medium:	s. 3.1
Ampicillin:	100 mg/ml
NaOH/SDS-Lösung.:	0,2 N NaOH, 1% SDS
Natriumacetat:	3M Natriumacetat (pH 4,8)
RNAse-Lösung.:	0,1 mg/ml RNAseA in 5 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Ethanol:	100%; 70% (v/v)

##### **Durchführung:**

Je 1ml L-Broth-Medium (mit 100 µg Ampicillin pro ml) wurden mit je einem über Antibiotikaresistenz vorselektionierten Bakterienklon unter Verwendung von sterilen Zahnstochern beimpft. Die Kulturgefäße wurden mit durchlöchernten Deckeln verschlossen und bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler (250 UpM) inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation in der Tischzentrifuge (13000 UpM) wurden die Bakterien in je 100 µl A. bid. resuspendiert und für 10 Minuten ins Eisbad gestellt. Anschließend wurden je 200 µl der NaOH/SDS-Lösung zupipettiert und die Proben für weitere 10 Minuten im Eisbad inkubiert. Nach der Neutralisation durch Zugabe von je 150 µl eiskalter Natriumacetatlösung, wurden die Ansätze für weitere 20 Minuten ins Eisbad gestellt. Nach 5 minütiger Zentrifugation wurde der Überstand abgehoben und die darin befindliche DNA mit zwei Volumenteilen Ethanol (100%) gefällt, 15 Minuten zentrifugiert und das Sediment mit Ethanol (70%) gewaschen. Das Präzipitat wurde schließlich in 40 µl A. bid. und 10 µl der RNAse-Lösung resuspendiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Je 10 µl dieser Plasmid-DNA Präparation wurden dann zur Restriktionsanalyse eingesetzt.

#### 3.2.2 *Präparative Isolierung von Plasmid-DNA*

Die Präparation von Plasmiden in größeren Mengen (2-5mg) erfolgte mit einem DNA-Präparationskit von Qiagen nach Vorschrift des Herstellers.

### **3.2.3 Standardbedingungen zur Fällung von Nukleinsäuren**

#### **Materialien:**

EtOH/NaAcetat (30:1):	100% Ethanol; 3 M Natriumacetat (pH 5,5)
Ethanol:	70% (v/v)

#### **Durchführung:**

Die zu fällende DNA-Lösung wurde mit 3 Volumenteilen Ethanol/Natriumacetat-Gemisch versetzt, vorsichtig gemischt und anschließend 20 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 13000 UpM zentrifugiert. Das Präzipitat wurde dann zur Entfernung von Salzresten kurz mit 70%igen Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und der Alkohol abgezogen. Das Präzipitat wurde getrocknet und in A. bid. oder entsprechendem Puffer gelöst.

### **3.2.4 Bestimmung der Konzentration von Desoxyribonukleinsäuren**

Bei größeren DNA-Mengen erfolgte die Konzentrationsbestimmung durch Extinktionsmessung bei 260 nm in 1 cm Quarzküvetten mit einem Beckmann Spektralphotometer. Nach Chargaff (1955) entspricht eine  $OD_{260} = 1$  einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Zur Bestimmung der Konzentration kleinerer Mengen DNA wurde der visuelle Vergleich mit Proben bekannter Konzentration nach Agarose-Gelelektrophorese (3.3.1) und anschließender Ethidiumbromidfärbung (3.2.6) herangezogen.

### **3.2.5 Spaltung mit Restriktionsenzymen**

Restriktionsendonukleasen stellen einen spezifischen Schutz vor Einbau und Expression fremder DNA in Bakterien dar. Durch Erkennen spezifischer Nukleotidsequenzen und darauffolgender endolytischer DNA-Spaltung wird in Bakterien Fremd-DNA inaktiviert. Bakterieneigene DNA ist hierbei durch Modifikation (z.B. Methylierung der Erkennungssequenz) vor der Spaltung geschützt. Um ein für eine effiziente Restriktion optimales Milieu zu erstellen, wurden, je nach verwendetem Enzym, die vom Hersteller mitgelieferten 10x Puffer eingesetzt. Ein typischer Restriktionsansatz enthielt neben der in A. bid. gelösten Proben-DNA 1/10 Volumenteil 10x Restriktionspuffer und entsprechende Mengen an Restriktionsenzym (max. 10% des Reaktionsend-

volumens = 5% Glyzerin-Endkonzentration). Die Berechnung der benötigten Enzymeinheiten erfolgte in Bezug auf die vom Hersteller angegebene Unit-Definition (1 Unit schneidet 1 µg Lambda DNA unter optimalen Bedingungen in einer Stunde). Die Inkubation erfolgte zwei bis vier Stunden bei der vom Hersteller genannten Temperatur und wurde, bei präparativen Spaltungen, vor dem Stoppen der Reaktion durch Erhitzen auf eine für das Enzym spezifische Denaturierungstemperatur auf einem Agarosegel (3.3.1) überprüft.

### **3.2.6 Anfärbung von Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid**

Im Gel fixierte DNA-Fragmente lassen sich durch Ethidiumbromid, eine polyzyklische, planare und chromophore Verbindung, die sich zwischen benachbarte Basenpaare der DNA einlagert, anfärben. Bei UV-Anregung fluoresziert der Interkalator mit einer Wellenlänge von 590 nm im rot-orangen Bereich des sichtbaren Spektrums.

#### **Materialien:**

Ethidiumbromid-Lösung:	1 µg/ml
------------------------	---------

#### **Durchführung:**

Zum Färben gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente wurden die Gele für 15-30 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung unter leichtem Schütteln gefärbt und danach 5-10 Minuten in Wasser entfärbt. Die angefärbten Nukleinsäuren wurden auf einem UV-Leuchtschirm bei 260 (analytisches Gel) oder 365 nm (präparatives Gel) sichtbar gemacht.

### **3.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen mittels Elektroelution**

#### **Materialien:**

Dialysierschlauch
-------------------

#### **Durchführung:**

Das Gelstückchen, das die angefärbte DNA enthielt, wurde mit einem Skalpell aus dem präparativen Gel ausgeschnitten und in einen Dialysierschlauch überführt, der mit 1x TBE gefüllt war. Dann wurde der Schlauch in eine Gelelektrophoresekommer senkrecht zum elektrischen Feld gelegt und die DNA

in ca. 30 Minuten bei 100 mA aus dem Gel eluiert. Um ein Anhaften am Schlauch zu vermeiden, wurde die Kammer kurz umgepolt und 30 sec in die entgegengesetzte Richtung Spannung angelegt. Dann wurde der Puffer aus dem Schlauch entnommen und die DNA unter Standardbedingungen gefällt.

### **3.2.8 Transformation**

Die Aufnahme freier DNA durch Bakterienzellen ist normalerweise kein effizienter Vorgang. Aus diesem Grunde müssen die Zellen zuvor durch eine Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$  „kompetent“, d.h. aufnahmebereit gemacht werden (Dagert und Ehrlich, 1979).

#### **Materialien:**

CaCl <sub>2</sub> -Puffer:	10 mM Pipes (pH 7,0); 60 mM CaCl <sub>2</sub>
Glyzerin:	15% (v/v)
L-Broth-Medium:	s. 3.1
<i>E.coli</i> :	XLI-Blue

#### **Durchführung:**

Zur Herstellung der „Ca<sup>2+</sup>-Zellen“ wurden 50ml L-Broth Flüssigmedium mit 2ml einer Übernachtskultur eines *E.coli* Stammes beimpft und im Schüttelinkubator (250 UpM, 37°C) bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>590</sub>) von 0,35 angezüchtet.

Die für 10 Minuten im Eisbad abgekühlte Bakteriensuspension wurde 5 Minuten bei 8000 x g (ca. 7000 UpM, Sorvall SS-34, 4°C) zentrifugiert, das Sediment gewaschen und anschließend vorsichtig in 10 ml eiskaltem CaCl<sub>2</sub>-Puffer resuspendiert. Unter gelegentlichem Schwenken wurden die Zellen für 30 Minuten im Eisbad inkubiert, erneut 5 Minuten zentrifugiert und schließlich in 2ml eiskaltem CaCl<sub>2</sub>-Puffer aufgenommen. Nach ca. 2 Stunden im Eisbad wurden die Zellen entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder portioniert bei -80°C eingefroren.

Im Transformationsansatz wurden jeweils 200 µl der „kompetenten“ Zellen mit 5-20 ng pDNA gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation im Eisbad wurde der Ansatz für 1 min auf 37°C erwärmt und anschließend sofort für 10 Minuten im Eisbad inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl vorgewärmten (37°C) LB-Medium wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert.



### **3.2.9 Selektion positiver Transformanten**

Durch die Insertion der zu klonierenden DNA in die Polylinkerregion der verwendeten pBluescript-Vektoren wird das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen inaktiviert (Insertionsinaktivierung der  $\alpha$ -Komplementation). Eine Selektion positiver Transformanten lässt sich somit bezüglich des defekten  $\beta$ -Galaktosidase-Gens und der Ampicillinresistenz durchführen. Positive Klone sollten auf ampicillinhaltigen Agarplatten mit dem Farbindikator X-Gal (Amp-X-Gal) weiße Kolonien bilden, während Transformanten ohne Insertion durch die funktionsfähige  $\beta$ -Galaktosidase beim Abbau des Farbstoffes eine tiefblaue Indigoverbindung bilden.

#### **Materialien:**

LB-Amp-X-Gal	L-Broth Kulturmedium s. 3.1.
Agarplatten:	1,5% (w/v) Agar; 50 mg/l Ampicillin; 0,01% (w/w) X-Gal gelöst in Dimethylformamid

#### **Durchführung:**

Jeweils 50-200  $\mu$ l Aliquots der Transformationsansätze (3.2.8) wurden auf L-Broth-Amp-X-Gal Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden für ca. 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Alle eindeutig positiven (weißen) Transformanten wurden zur weiteren Charakterisierung in den "Mini-Screen" (3.2.1) eingesetzt.

### **3.2.10 PCR**

Die Methode der PCR (polymerase chain reaction) ist ein Verfahren zur Amplifikation beliebiger Nukleinsäureabschnitte. Es hybridisieren zwei spezifische Oligonukleotid-primere mit jeweils einem Strang der DNA-Matrize. Diese doppelsträngigen Bereiche mit einem freien 3'OH-Ende dienen als Startpunkte für die thermostabile DNA-Polymerase, die nach Vorlage der DNA zwischen beiden Primern ein Fragment definierter Länge und Sequenz synthetisiert. Durch Temperaturerhöhung denaturiert die neusynthetisierte doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge. Es können erneut Primer hybridisieren und der Prozess wiederholt sich. Es kommt somit zu einer exponentiellen Amplifikation.

### Materialien:

Plasmid-DNA /Fragment-DNA):	10 ng (1 ng)
10x Reaktionspuffer (mit MgCl <sub>2</sub> )	
Desoxynukleotidgemisch :	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Taq-Polymerase:	5 U/μl
spezifische Oligonukleotide (Primer):	jeweils (40 pmol/μl)

### Durchführung:

Die Amplifizierung eines DNA-Fragmentes an Plasmid-DNA zwischen zwei spezifischen Primern erfolgte typischerweise nach folgendem Reaktionsschema:

Plasmid-DNA	10 ng
10 x Reaktionspuffer	5 μl
Desoxynukleotide (dNTPs)	2 μl
5'-spezifischer Primer	40 pmol (analytisch) bzw. 80 pmol (präparativ)
3'-spezifischer Primer	40 pmol (analytisch) bzw. 80 pmol (präparativ)
Taq-Polymerase	2,5 U
A.bid.	ad 50 μl

Die Amplifizierung des interessierenden DNA-Fragmentes erfolgte in einem Stratagene Thermocycler mit beheizbarem Deckel. Insgesamt wurden 30 Zyklen (präparativ) durchgeführt, wobei jeder Zyklus aus 3 Segmenten wie folgt bestand:

94°C, 1 Minute	(Denaturierung)
54°C, 1,5 Minuten	(Hybridisierung)
72°C, 1,5 Minuten	(Elongation)

Zu Beginn des ersten Zyklus wurde ein fünfminütiger Denaturierungsschritt bei 94°C vor-geschaltet. Nach Beendigung des letzten Zyklus folgte noch eine zehnminütige Elongation bei 72°C. Die PCR-Ansätze wurden auf ein präparatives Polyacrylamid-Gel (3.3.3) aufgetragen. Das Gel wurde Ethidiumbromid gefärbt (3.2.6) und die gewünschte DNA-Bande ausgeschnitten. Die DNA wurde gemäß 3.2.7 elektroeluiert, unter Standardbedingungen gefällt (3.2.3), in maximal TE-Puffer oder Wasser resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt. Alternativ wurde das Produkt nach 3.2.11 von den freien Primern abgetrennt.

### **3.2.11 Abtrennung nicht-inkorporierter Oligonukleotide von PCR-Produkten**

Die Abtrennung nicht-inkorporierter Oligonukleotide von PCR-Produkten erfolgte über StrataPrep™ PCR Purification Kit der Firma Stratagene entsprechend der Anleitung des Herstellers.

## **3.3 Gelelektrophoretische Methoden**

### **3.3.1 Agarosegele**

Zur Größen- und Konzentrationsbestimmung großer DNA-Fragmente (>600 bp) dienten native Agarose-Gele. Die Elektrophorese erfolgte in Gelen mit einem Agarosegehalt von 1% (w/v).

#### **Materialien:**

Agarose	
5x TBE-Puffer:	450 mM Tris; 450 mM Borsäure; 1,5 mM EDTA
10x TBE Probenpuffer:	10x TBE mit 50% (w/v) Saccharose; 1% (w/v) Bromphenolblau; 1% (w/v) Xylencyanol
Geltyp:	Flachbett-Gele
Lauf:	0,5 - 2 Stunden bei 5V/cm Elektrodenabstand

#### **Durchführung:**

Die entsprechende Menge Agarose wurde unter Aufkochen in 1x TBE-Puffer gelöst und nach kurzzeitigem Abkühlen in die Gelapparatur gegossen. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele gefärbt (3.2.6) und die Größe und ggf. die Menge der aufgetragenen DNA-Fragmente durch Vergleich mit Markerfragmenten bekannter Größe und Konzentration nach (3.2.4) bestimmt. Sehr dicke Agarosegele wurden bereits vor dem Gießen mit Ethidiumbromid versetzt. Während des Gellaufes wurde in diesem Fall ebenso der Puffer mit der gleichen Ethidiumbromidkonzentration versetzt.

### 3.3.2 Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele

Zur Analyse der durch *in vitro* Transkription synthetisierten radioaktiv markierten RNA-Moleküle wurden denaturierende 6% ige Polyacrylamidgele verwendet.

#### Materialien:

Acrylamid / Bisacrylamid (AA/BA)	28,5% (w/v) : 1,5% (w/v)
Harnstoff	
5x TBE-Puffer:	3.3.1
Laufpuffer:	1x TBE-Puffer
Silikonlösung.:	4% (v/v) Dichlorodimethylsilan in Chloroform
TEMED	
APS:	10% (w/v)
Geltyp:	vertikales Gel
Lauf:	1,5-2 Stunden bei 800 V

#### Durchführung:

Die 6%igen Gele enthielten bei einem Endvolumen von 70 ml:

14 ml AA/BA-Lösung
35 g Harnstoff
14 ml 5x TBE-Puffer
A. bid. ad 70 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert. Bevor die Gelapparatur zusammengesetzt werden konnte, wurde eine der Glasplatten mit Silikonisierungslösung behandelt. Die Polymerisation wurde mit 30 µl TEMED und 600 µl APS eingeleitet. Nach einer Polymerisationszeit von mindestens 60 Minuten wurden die Proben aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel zur qualitativen Analyse autoradiographiert (3.9.1 bzw. 3.9.2).

### 3.3.3 Nichtdenaturierende Polyacrylamidgele zur nativen DNA-Auftrennung

Zur Größenbestimmung und Präparation kleinerer DNA-Fragmente (<600bp) wurden 5-20%ige native Polyacrylamid-Gele benutzt.

**Materialien:**

AA/BA-Lösung:	30% (w/v) : 1% (w/v)
5x TBE-Puffer:	3.3.1
10x Probenpuffer:	3.3.1
TEMED	
APS:	10% (w/v)
Laufpuffer:	1x TBE-Puffer
Geltyp:	vertikales Gel (125 mm x 100 mm x 1,5 mm)
Lauf:	1-2 Stunden bei 80 mA

**Durchführung:**

Zur Polymerisation wurden 30 µl TEMED und 300 µl APS zugegeben. Der Probenauftrag erfolgte nach einer Polymerisationszeit von 30 Minuten. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Die Gele wurden gefärbt (3.2.6) und bei 260 nm auf einem Leuchtschirm fotografiert (analytische Gele) oder auf einem 365 nm Leuchtschirm die spezifischen Banden ausgeschnitten (präparative Gele).

### **3.3.4 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (nach Laemmli, 1970)**

**Materialien:**

AA / BA-Lösung:	30% (w/v) : 0,8% (w/v);
Tris-HCl	1,5 M, pH 8,6 für Trenngel 0,5 M, pH 6,8 für Sammelgel
SDS	20% (w/v)
Gelkammer:	Vertikaler Typ
Probenpuffer:	50 mM Tris-HCl (pH 6,8); 10% Glycerin; 1% (w/v) SDS; 50 mM DTT; 0,01% (w/v) Bromphenolblau
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris-HCl (pH 6,8); 190 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS
APS	10% (w/v)
n-Butanol	H <sub>2</sub> O-gesättigt
TEMED	

**Durchführung:**

Das Sammelgel (4%) enthielt bei einem Volumen von 20 ml:

2,6 ml AA/BA 30:0,8
4 ml Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8
96,6 µl 20% (w/v) SDS
A. bid. ad. 20 ml

Das Trenngel (8% bzw. 10%) enthielt bei einem Volumen von 50 ml:

12,5 ml bzw. 15,8 ml AA/BA
11,6 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,6
241,5 µl 20% SDS
A. bid. ad. 50 ml

Glasplatten, Spacer und Probenkamm wurden gewaschen und über Nacht in 1 M NaOH oder 1%ige SDS-Lösung eingelegt. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert. Zunächst wurde die Polymerisation des Trenngels mit 25 µl TEMED und 500 µl APS initiiert, das Gel in die Gelkammer gegossen und sofort mit n-Butanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das n-Butanol abgegossen, mit A.bid. ausgespült und das mit 13,3 µl TEMED und 133 µl APS versetzte Sammelgel über das polymerisierte Trenngel gegeben. Die zu analysierenden Proteinfractionen wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und 15 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben 10 Minuten bei 95°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte entweder über Nacht bei 10 mA oder am Tag bei 40 mA. Anschließend wurden die Proteine nach 3.6.12 oder 3.6.13 gefärbt, oder das Gel wurde geblottet (3.6.10).

### 3.4 Zellkultur

#### 3.4.1 Anzucht von Maus F9 Embryonalen Carcinomazellen

##### Materialien:

Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	
New Born Kälberserum	
Antibiotika-Lösung:	Penicillin: 1000 U/ml; Streptomycin: 755 U/ml
Natriumhydrogencarbonat	
Gelatine	
PBS-Waschpuffer	
Trypsin / EDTA-Lösung	0,5% / 0,2% in PBS

### Durchführung:

Die Anzucht und Stammhaltung von F9 Zellen erfolgte in DMEM Fertigmedium unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum, 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin-Lösung und 3,7 mg/ml Natriumhydrogencarbonat. Um eine bessere Haftung der Zellen zu erreichen, wurden die Kulturgefäße zuvor mit einer 0,1%igen Gelatinelösung behandelt. F9 Zellen haben eine hohe Wachstumsrate und zeigen Kontaktinhibierung. Somit mussten die Zellen jeden zweiten Tag "passagiert" werden. Hierzu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen kurz mit PBS gewaschen und für einige Minuten mit der Trypsin / EDTA-Lösung behandelt, wodurch sich die Zellen vom Kulturgefäß ablösen. Die abpipettierten Zellen wurden 10 min zentrifugiert und anschließend auf neue, mit frischem Medium befüllte Kulturgefäße verteilt. Durch kontinuierliches Passagieren konnten die Zellen nach 6-7 Tagen geerntet werden. Die Extraktpräparation erfolgte wie unter 3.5.1 beschrieben.

#### 3.4.1.1 Differenzierung von F9 Embryonalen Carcinomazellen (EC) zu F9 Parientalen Endodermzellen (PE)

### Material:

Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	
New Born Kälberserum	
Antibiotika-Lösung:	Penicillin: 1000 U/ml; Streptomycin: 755 U/ml
Natriumhydrogencarbonat	
Gelatine	
PBS-Waschpuffer	
Trypsin / EDTA-Lösung	0,5% / 0,2% in PBS
Retinsäure	$1 \times 10^{-6}$ M
cAMP	$1 \times 10^{-3}$ M
Xanthin	$1 \times 10^{-4}$ M

### Durchführung:

Die Differenzierung der Zellen wurde durch Zusatz von Retinsäure, cAMP und Xanthin zum Medium in den angegebenen Endkonzentrationen eingeleitet. Nach zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden nach 3, 4, 5, 6 und 7 Tagen Differenzierung geerntet. Die Extraktpräparation erfolgte wie unter 3.5.1 beschrieben.

### 3.4.2 Anzucht menschlicher Tumorzellen in Suspensionskultur

#### Materialien:

Eagle`s Minimalmedium	
New Born Kälberserum	
Antibiotika-Lösung:	Penicillin: 1000 U/ml; Streptomycin: 755 U/ml
Streptomycinsulfat	
Natriumhydrogencarbonat	

#### Durchführung:

Anzucht und Stammhaltung der menschlichen Cervix-Karzinom-Zelllinie HeLa und der embryonalen Nierenzelllinie HEK erfolgte in „Eagle's minimal essential medium“ (S-MEM) unter Zusatz von 5% (v/v) „new born“ Kälberserum, 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin-Lösung, 0,1 mg/ml Streptomycinsulfat und 2,2 mg/ml Natriumhydrogen-carbonat bis zu einer Zelldichte von  $4-6 \times 10^5$  Zellen pro ml Medium.

### 3.4.3 Expression monoklonaler Antikörper

#### Materialien:

Hybridoma-Medium	
Fätales Kälberserum	
L-Glutamin	200 mM
Penicillin/Streptomycin-Lösung	10000 µg/ml

#### Durchführung:

Die Hybridomazelllinie H-Mab-TBP, die Antikörper gegen TBP erzeugt, wurde in Hybridomamedium angezogen unter Zusatz von 10% Fätalem Kälberserum, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung. Nach ca. 4-6 Tagen Inkubation in Kulturflaschen (das Medium soll bereits gelb gefärbt sein) wurde ein kleines Aliquot ca. 1:30 mit frischem Medium verdünnt und erneut inkubiert. Die restliche Zellsuspension wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (10 min bei 800 UpM, Heraeus Cryofuge 6-6). Da die Antikörper von den Zellen in das Medium sezerniert werden, wurde das Pellet verworfen (alternativ wurde es auch zur weiteren Anzucht resuspendiert) und die Antikörper aus den



Zellüberständen nach 3.6.6 isoliert. Die Anti-TBP Zelllinie wurde in RPMI 1640 Medium gezogen.

### 3.5 Präparation zellfreier Extrakte

#### 3.5.1 *Präparation von zytoplasmatischem Extrakt (S100) aus HEK-Zellen, F9 EC- und F9 PE-Zellen (nach Weil et al., 1979)*

##### **Materialien:**

Puffer 1:	30 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl
Puffer 2:	10 mM Tris-HCl (pH 7,9); 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,5 mM DTT
Puffer 3:	300 mM Tris-HCl (pH 7,9); 1,4 M KCl; 30 mM MgCl <sub>2</sub>
DTT	
PMSF:	100 mM in Isopropanol

##### **Durchführung:**

Die Zellen wurden durch zehnminütige Zentrifugation bei 1000 x g (1300 UpM, 4°C) sedimentiert und mit Puffer 1 gewaschen. Nach Bestimmung des „packed-cell-volume“ (PCV) wurden die Zellen anschließend durch Aufnahme in 2,5 x PCV hypotonem Puffer 2 und Inkubation für 20 Minuten im Eisbad zum Quellen gebracht. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese im Potter homogenisiert, wobei die Vollständigkeit der Homogenisierung lichtmikroskopisch verfolgt wurde (Zerstörung der Zellmembran unter Erhalt der intakten Kerne). Nachdem durch Zufügen von 1/10 Volumenteil hypertonem Puffer 3 wieder isotonische Bedingungen hergestellt worden waren, folgte eine Ultrazentrifugation für 90 Minuten bei 100000 x g (= 33000 UpM; Beckmann Ti 60) und 4°C, bei der Kerne und Zelltrümmer sedimentieren. Der „S100“-Überstand (S = Supernatant) wurde dekantiert mit Glycerin auf eine Endkonzentration von ca 10% Glycerin verdünnt, mit 3 mM DTT und 0,2 mM PMSF versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Die Proteinkonzentration der Überstände betrug 10-15 mg/ml für HEK-Zellen, 10-20 mg/ml für F9 EC-Zellen bzw. 5-10 mg/ml für F9 PE-Zellen.

### 3.5.2 Präparation von Kernextrakt (modifiziert nach Shapiro et al., 1988)

#### Materialien:

Puffer 1:	30 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl;
Puffer 2:	10 mM Hepes (pH 7,9); 0,75 mM Spermidin-3HCl; 0,15 mM Spermin-3HCl, 0,1 mM EDTA (pH 8); 0,1 mM EGTA (pH 8), 7,5 mM DTT; 10 mM KCl
Puffer 3:	0,5 M Hepes (pH 7,9); 7,5 mM Spermidin-3 HCl; 1,5 mM Spermin-3 HCl, 100 mM KCl; 2 mM EDTA; 7,5 mM DTT
Puffer 4:	9 Volumen 75% (w/v) Saccharose, 1 Vol. Puffer 3
Puffer 5:	20 mM Hepes (pH 7,9); 0,75 mM Spermidin-3 HCl, 0,15 mM Spermin-3HCl, 0,2 mM EDTA; 0,2 mM EGTA, 7,5 mM DTT; 25% Glyzerin
Ammonium-sulfatlösung	gesättigte Lösung bei 0°C (>3,9 M Ammoniumsulfat)

#### Durchführung:

Bei einer Zelldichte von  $4-7 \times 10^5$  Zellen / ml Medium wurden die Zellen durch 10 min Zentrifugation bei 700 UpM ( $170 \times g$ ) und 4°C pelletiert und dann in Puffer 1 gewaschen. Das PCV („packed cell volume“) wurde durch Aufnahme der Zellen in 100 ml Puffer 1 bestimmt ( $PCV = x \cdot 100 \text{ ml}$ ). Die Zellen wurden in 5 x PCV (hypotonem) Puffer 2 aufgenommen und für 10 Minuten auf Eis quellen gelassen. Nach erneuter Pelletierung und Aufnahme in 2 x PCV Puffer 2 wurden die Zellen durch fünfmaliges Pottern aufgeschlossen. Um die noch intakte Kernmembran zu schützen, wurde zügig durch Zugabe von 0,1 VT Puffer 4 wieder isotone Verhältnisse geschaffen. Danach wurden die Kerne durch 30-60 Sekunden Zentrifugation bei 10000 UpM im Sorvall HB4-Rotor pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet aus den Kernen wurde in  $3 \text{ ml} / 10^9$  Zellen Puffer 5 durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren in einer 10 ml Glaspipette homogenisiert und in ein Becherglas großen Durchmessers überführt. Über 10 Minuten wurden 0,1 Volumenteile der gesättigten Ammoniumsulfatlösung tropfenweise zugesetzt und somit die Kerne aufgeschlossen. Nach Zugabe etwa der Hälfte der Ammoniumsulfatlösung bildete sich ein zäher Schleim. Nach weiteren 30 Minuten Rühren wurde die hochvisköse Lösung in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und 90 Minuten bei 40000 UpM ( $180000 \times g$ , Beckmann Ti-55.2, 4°C) zentrifugiert. Danach

wurde vorsichtig eine kleine Lipidschicht abgehoben und der Überstand dekantiert. Dieser wurde unter zweimaligem Pufferwechsel 6-8 Stunden gegen Phosphocellulosepuffer dialysiert (3.6.3).

### **3.6 Arbeiten mit Proteinen**

#### **3.6.1 Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat**

##### **Materialien:**

Ammoniumsulfat
Dialysierschlauch

##### **Durchführung:**

Die Proteinfractionen wurden in Dialyseschläuchen in Transkriptionspuffer (3.8.1) dialysiert (3.6.3), der die entsprechenden Ammoniumsulfatkonzentrationen enthielt. Dann wurde die Lösung 60 Minuten in einer Sorvall Zentrifuge bei 9000 UpM (HB-4 Rotor; 4°C) zentrifugiert. Das Sediment wurde in einem geringen Volumen Transkriptionspuffer aufgenommen und ebenso wie der Überstand gegen Transkriptionspuffer (3.8.1) dialysiert (3.6.3).

#### **3.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung durch kolorimetrische Proteinquantifizierung (Bradford, 1976)**

Zur kolorimetrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das "Protein dye reagent concentrate" der Firma Biorad nach Vorschrift angewandt und die Extinktion bei 595 nm im Vergleich zu BSA-Standardwerten gemessen.

#### **3.6.3 Dialyse von Proteinlösungen**

##### **Materialien:**

Dialysierschläuche	
Mikrokollodiumhülsen	
BSA	20 mg/ml in Transkriptionspuffer (3.8.1)

**Durchführung:**

Die Dialyse von Zellextrakten oder gereinigten Proteinfractionen erfolgte bei kleineren Mengen (100-500 µl) in Mikro-Kollodiumhülsen der Firma Sartorius, bei größeren Mengen in Dialysierschläuchen. Die Schläuche wurden zur Entfernung enzymatischer Verunreinigungen und zum Quellen vor Gebrauch kurz aufgekocht. Der Puffer wurde vor Verwendung mittels einer Wasserstrahlpumpe entgast. Die Proben wurden bei 4°C so lange gegen den gewünschten Puffer dialysiert, bis die Leitfähigkeit der Proben mit der des umgebenden Puffers übereinstimmte.

**3.6.4 Umpuffern von Proteinlösungen per Gelfiltration****Materialien:**

Chromatographiesäule	Sephadex G25 (XK 26/10)
----------------------	-------------------------

**Durchführung:**

Mit der Gelfiltration können Moleküle nach ihrer Größe voneinander getrennt werden (3.7.2.3). Das Sephadex G25 Material wird für das Abtrennen von Salzen aus Proteinlösungen eingesetzt, da Proteine wesentlich früher von der Säule eluieren, als Salze. Nach der Umpufferung befinden sich die Proteine in demjenigen Puffer, welcher als Laufpuffer verwendet worden ist. Vor dem Auftrag der umzupuffernden Proteinfraction wurde die Säule mit zwei Säulenvolumina Laufpuffer (meistens 1x Transkriptionspuffer, 3.8.1) äquilibriert. Maximal 35 ml Proteinfraction wurden auf die Säule gegeben. Die Proteine wurden getrennt vom Salz gesammelt.

**3.6.5 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine (TBP) aus *E. coli***

Es wurde hTBP wt in XL1-Blue Zellen exprimiert. Als Expressionsvektor diente pQE31 und das exprimierte TBP war am aminoterminalen Ende mit sechs Histidinresten versehen. Die Expression des Gens stand unter der Kontrolle des T5 Promotors. Dieser war aufgrund zweier lac-Operatoren durch den in XL1-Blue Zellen exprimierten lac-Repressor blockiert. Jedoch konnte durch Zugabe von IPTG zu exponentiell wachsenden transformierten Bakterien der lac-Repressor inaktiviert werden und damit das rekombinante Protein exprimiert

werden. Der Vorteil von IPTG ist, dass es die Proteinsynthese induziert ohne von der Zelle metabolisiert zu werden.

**Materialien:**

LB-Medium	
LB-Agar-Platten	
Ampicillin	100 mg/ml
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
<i>E.coli</i>	XL1-Blue
Expressionsvektor	pQE31
Waschpuffer	20 mM Hepes; 10% Glyzerin; 0,2 mM PMSF; 750 mM KCl
Aufschlußpuffer	20 mM Hepes; 10% Glyzerin; 0,2mM PMSF; 750 mM KCl; 1 mg/ml Lysozym; 4 $\mu$ l/ml Protease Inhibitor Cocktail (PIC)

**Durchführung**

Zunächst wurden 200  $\mu$ l kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen mit 5 ng eines Expressionsvektors transformiert und anschließend auf Agar-Amp-Platten ausplattiert. Positive Klone wurden in eine Vorkultur überimpft (500 ml LB-Medium, 0,5 ml Ampicillin) und bei 37°C über Nacht auf dem Schüttler (250 UpM) inkubiert. Am nächsten Morgen wurde erneut eine Vorkultur angeimpft (5 ml der Übernacht-Kultur, 50 ml LB-Medium, 50  $\mu$ l Ampicillin), welche im 37°C-Schüttler bis zu einer OD<sub>595</sub> von 0,4 inkubiert wurde. Anschließend wurden 25 ml der Vorkultur in eine 1000 ml Hauptkultur überführt. Diese wurde ebenso im Schüttler inkubiert und stündlich wurde die OD bei 595 nm bestimmt. Alle zwei Stunden wurde dem Medium 1 ml Ampicillin zugegeben, da die Zellen während des Wachstums  $\beta$ -Lactamase freisetzen, welches Ampicillin spaltet, wodurch keine Selektion positiver Bakterienzellen aufgrund der Ampicillinresistenz mehr gewährleistet wäre.

Als die OD einen Wert von 0,6 erreicht hatte, wurde die Proteinsynthese durch 40  $\mu$ M IPTG induziert. Zwei Stunden nach der Induktion wurden die Zellen bei 3000 UpM (Heraeus-552) und 4°C für 45 Minuten abzentrifugiert. Die Zellsedimente wurden dann in 40 ml Waschpuffer aufgenommen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml Aufschlußpuffer resuspendiert und 1,5 Stunden auf Eis gestellt, damit das Lysozym die

Bakterienzellwand enzymatisch auflösen konnte. Danach wurden die Zellen zusätzlich durch Ultraschall aufgeschlossen. Unlösliches Material wurde durch 60 minütige Zentrifugation bei 4°C und 14000 UpM (Sorvall SS-34) sedimentiert. Das exprimierte TBP befand sich im Überstand und wurde mittels Ni<sup>2+</sup> NTA Agarose-Chromatographie (3.3.1) weitergereinigt, wobei rekombinantes TBP bei 100 mM Imidazol eluierte.

### **3.6.6 Reinigung von monoklonalen Antikörpern aus Hybridoma-Zellüberständen.**

#### **Materialien:**

Chromatographiesäule	HiTrap™ ProteinG (1 ml)
Waschpuffer	1x Transkriptionspuffer, 600 mM KCl
Elutionspuffer	0,1 M Essigsäure, 0,15 M NaCl, pH 2,75
Neutralisationspuffer	1M Tris, pH 7,9

#### **Durchführung:**

Nach Abzentrifugieren der Zellen (3.4.3) wurden ca. 500-1000 ml Überstand bei 4°C über eine 1 ml HiTrap™ ProteinG Säule gegeben. Nach einem Waschschrift wurden die Antikörper mit dem Elutionspuffer in ein Gefäß eluiert, in das zuvor ca. 1/10 des zu erwartenden Elutionsvolumens (ca. 3 ml) Neutralisationspuffer gegeben wurde. Sofort wurden die Antikörper unter mehrmaligem Wechseln des Puffers gegen 1 x Transkriptionspuffer (3.8.1) über Nacht dialysiert (3.6.3). Die Reinheit der Antikörper wurde durch SDS Gelelektrophorese (3.3.4) und nachfolgender Coomassiefärbung (3.6.12) bestimmt, ihre Aktivität mittels eines Streifenblots (3.6.10.1) bestimmt.

### **3.6.7 Reinigung von IgGs aus Kaninchen-Serum**

#### **Materialien:**

Chromatographiesäule	HiTrap™ ProteinG (1 ml)
Waschpuffer	1x Transkriptionspuffer (3.8.1), 600 mM KCl
Elutionspuffer	0,1 M Essigsäure, 0,15 M NaCl, pH 2,75
Neutralisationspuffer	1M Tris, pH 7,9

### Durchführung:

10 ml Kaninchenserum wurden über eine 1 ml ProteinG HiTrap™ Säule gegeben. Nach einem Waschschrift wurden die Antikörper mit dem Elutionspuffer in ein Gefäß eluiert, in das zuvor ca. 1/10 des erwartenden Elutionsvolumens (ca. 3 ml) Neutralisationspuffer gegeben wurde. Sofort wurden die Antikörper unter mehrmaligem Wechseln des Puffers gegen 1x Transkriptionspuffer über Nacht dialysiert (3.6.3.). Die Reinheit der Antikörper wurde durch SDS Gelelektrophorese (3.3.4.) und nachfolgender Coomassiefärbung (3.6.12) bestimmt.

### 3.6.8 Irreversible Immobilisierung von Antikörpern an HiTrap Protein G Säulen

#### Materialien:

Matrix	HiTrap™ ProteinG Säule (1 ml)
Bindungspuffer	1x Transkriptionspuffer (3.8.1)
Waschpuffer 1	3 M NaCl, 50 mM Natriumborat (pH 9)
Waschpuffer 2	3 M NaCl, 200 mM Natriumborat (pH 9)
Kopplungspuffer	3 M NaCl, 200 mM Natriumborat, 20 mM Dimethylpimelimidat
Stopppuffer	200 mM Ethanolamin (pH 8,0)
Natriumazid	20% (w/v)

### Durchführung:

Nachdem die monoklonalen Antikörper bzw. die Serumantikörper nach 3.6.6. bzw. 3.6.7. gereinigt worden sind und ggf. auf ihre Aktivität untersucht wurden, wurden jeweils 0,7 mg Antikörper auf eine 1ml HiTrap™ ProteinG Säule aufgetragen (0,2 SV/min). Danach wurden 10 SV (=10 ml) Waschpuffer 1 und 10 SV Waschpuffer 2 über die Säule gegeben. Die Bindungseffizienz wurde auf einem SDS-Gel überprüft (3.3.4). Sie betrug in jedem Fall > 95%. Der Kopplungspuffer (10SV = 10 ml) wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,25 SV/min (=0,25 ml/SV) über die Säule gegeben, so dass die Inkubation für 40 Minuten erfolgte. Anschließend wurde durch den Stopppuffer die Kopplung beendet und ungenutzte ProteinG Bindungsstellen blockiert (ca. 40 SV bei 0,2 SV/min). Die Säule wurde mit 1 x Transkriptionspuffer äquilibriert und war dann

bereit für Immunodepletionen. Längere Lagerungen der HiTrap™ Säule erfolgten unter 1x PBS / 0,02% Natriumazid.

### **3.6.9 Immunodepletion / Immunopräzipitation mittels Säulen-chromatographie**

#### **Materialien:**

Blockierungslösung	2 mg/ml BSA in 1 x Transkriptionspuffer
Antikörpersäulen	HiTrap™ ProteinG, kovalent gekoppelt mit Antikörpern gegen Bdp1 oder mit Serum-Antikörpern (3.6.8)
Waschpuffer	1x Transkriptionspuffer, 600 mM KCl
Elutionspuffer	0,1 M Glycin, pH 2,7; „non-denaturing Elution Buffer“, pH neutral (Interchim)

#### **Durchführung:**

Die Immunodepletion wurde an einem Äkta Purifier von Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt. Die Antikörpersäule, die nach 3.6.8 präpariert worden ist, wurde zunächst mit der Blockierungslösung unter langsamen Fluss für ca. 20 Minuten behandelt, um unspezifische Bindungen der Proteine der Probe mit dem Säulenmaterial zu vermeiden. Anschließend wurde die Säule mit 1x Transkriptionspuffer (60 / 200 mM KCl) äquilibriert. Die zu depletierende Proteinfraction wurde mit 0,1 ml/min über die Säule gegeben. Der Durchbruch wurde fraktioniert aufgefangen. Anschließend wurden etwaige unspezifische Assoziate mit dem Waschpuffer entfernt. Zur Elution der Antigene wurde entweder 0,1 M Glycin-HCl (pH 2,7) oder ein spezieller pH neutraler Elutionspuffer der Firma Interchim verwendet. Anschließend wurde die Säule in 1x PBS überführt.

### **3.6.10 Immunodetektion von Proteinen (Western-Blot)**

Bei diesem Verfahren werden Proteine zunächst gelelektrophoretisch nach Größe getrennt (3.3.4). Anschließend werden die Proteine aus der Gelmatrix auf PVDF-Trägermembran (Immobilon-P Transfermembran) übertragen und dort immobilisiert. In einem weiteren Schritt können bestimmte Proteine durch Reaktion mit Antikörpern detektiert werden.



### 3.6.10.1 Transfer elektrophoretisch getrennter Proteine auf PVDF-Transfermembran

#### Materialien:

Transfermembran	Immobilon™-P-Transfermembran
Kathodenlösung:	25 mM Tris; 40 mM 6- Aminohexan; 20% (v/v) Methanol
Anodenlösung I:	30 mM Tris; 20% (v/v) Methanol
Anodenlösung II:	300 mM Tris; 20% (v/v) Methanol
Filterpapier:	Whatman 17CHR
Ponceau- Färber:	0,2 % (w/v) Ponceau S in 3% TCA
PBS	150 mM NaCl; 16 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBS/Tween-Puffer	0,05% (v/v) Tween 20 in PBS

#### Durchführung:

Die nach 3.3.4 über SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden in einem "semi-dry-Blotting" Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) auf eine Transfermembran übertragen. Die Transfermembran muss vor Gebrauch 30 Sekunden in 100% Methanol und anschließend 2 Minuten in A.bid. geschwenkt werden. Anschließend wurde sie 15 Minuten in Anodenlösung I äquilibriert. Dann wurden auf die Graphitkathode der Blotapparatur zunächst zwei auf Gelgröße zurechtgeschnittene, in Kathodenlösung getränkte Filterpapiere und anschließend das für ca. 15 Minuten in Kathodenlösung getränkte Gel blasenfrei aufgelegt. Darauf wurden in jeweils identischen Größen die Transfermembran und zwei Filterpapiere, welche vorher in Anodenlösung I getränkt worden sind, gelegt. Zum Abschluss wurden 2 weitere Whatman-Filterpapiere mit Anodenlösung II benetzt, blasenfrei aufgelegt und durch die Graphit-Anode komplettiert. Der Proteintransfer erfolgte 2 Stunden bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche. Anschließend wurde die Bloteffizienz durch reversible Anfärbung der Proteine mit Ponceau-Lösung überprüft und mit dem Coomassie-Blue gefärbten Gel verglichen. Die Bahnen sowie die Größenstandards wurden auf der Membran mit einem Kugelschreiber markiert. Anschließend wurde die vollständige Entfärbung der rotgefärbten Proteinbanden durch Waschen der Membran mit PBS/Tween-Puffer erreicht. Sollte die optimale Konzentration einer der Antikörper bestimmt werden, wurde ein „Streifenblot“ erstellt. Ein präparatives SDS-Gel mit nur einer präparativen

Tasche und einer Testfraktion wurde wie üblich geblottet. Nach der Ponceaufärbung wurde die Membran in vertikale Streifen von 3 mm Breite geschnitten. Die Streifen wurden separat in Streifenkammern gelegt und dann wie üblich (3.6.10.2) geblockt und anschließend mit unterschiedlichen Verdünnungen des zu testenden Antikörpers inkubiert.

### **3.6.10.2 Nachweis spezifischer Proteine durch Antigen-Antikörper-Wechselwirkung**

#### **Materialien:**

PBS:	150 mM NaCl; 16 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBS/ Tween:	0,05% (v/v) Tween 20 in PBS
Blockierungslösung:	10 % Magermilchpulver in PBS/ Tween 20
„Zweiter“- Antikörper:	anti-mouse Ig/anti-rabbit Ig, markiert mit <sup>125</sup> I (100 µCi/ ml) in Blockierungslösung gelöst (0,6-1,2 µCi/ml); oder: anti-mouse Ig/ anti-rabbit Ig, gekoppelt mit Meerettich Peroxidase in Blockierungslösung (1:2000)
„Erster“- Antikörper:	Je nach Bedarf in Blockierungslösung gelöst
ECL™ Western blotting detection reagents	

#### **Durchführung:**

Zur Absättigung der auf der Transfermembran vorhandenen Proteinbindungsstellen wurden die geblotteten Membranen 60 Minuten in Blockierungslösung inkubiert. Danach wurde die Membran mit einer entsprechenden Verdünnung des ersten Antikörpers für 2 Stunden bei RT oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Entfernung der Antikörperlösung wurde die Membran 3x (je 10 Minuten) mit PBS/ Tween-Puffer gewaschen und dann bei RT zwei Stunden mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in jeweils PBS/Tween und PBS-Puffer (je 10 Minuten) wurde die Membran im Falle des Iod-markierten Antikörpers 30 Sekunden in 100% Methanol geschwenkt und auf einem Whatman Papier getrocknet. Dann erfolgte der Nachweis der spezifischen Antikörper-Antigen-Wechselwirkung durch Autoradiographie mit Verstärkerfolie (3.9.1) bzw. durch einen Phosphor Imager (3.9.2).

Wurde der Peroxidase-gekoppelte Zweit-Antikörper verwendet, wurde die Membran nach dem letzten PBS-Waschschrift in 20 ml nach Vorschrift des

Herstellers gemischter ECL Lösung überführt, eine Minute inkubiert, mit einer Folie überzogen und ohne Verstärkerfolie autoradiographiert. Die Expositionsdauer betrug zwischen 10 Sekunden und 45 Minuten.

### **3.6.11 Konzentrieren von Proteinlösungen für SDS-Gel-Elektrophorese mit Strataclean™ Resin**

Diese Methode wurde zur Abtrennung von Proteinen (z.B. Restriktionsenzymen) von DNA entwickelt, kann aber auch zur Konzentrierung von Proteinfractionen benutzt werden. Es weist bei neutralem pH eine extrem hohe Affinität zu Proteinen und eine extrem geringe Affinität zu Nukleinsäuren auf. Im vorliegenden Fall wurden gesammelte Fraktionen aus Gelfiltrationen oder Ionenaustauschchromatographien auf diese Weise konzentriert, um Western-Blot Analysen (3.6.10) durchzuführen. 10 µl (50% w/v) Stratagene™ Resin binden 5µg BSA quantitativ (Tiefenbach, 1998).

#### **Materialien:**

Strataclean™ Resin Silica Partikel	(ca. 50 w/v)
------------------------------------	--------------

#### **Durchführung:**

Die Fraktionen wurden mit 10-25 µl Strataclean™ Resin versetzt und bei RT für 2 Stunden um die Querachse rotierend inkubiert. Danach wurde der Überstand bis auf ein geringes Restvolumen abgenommen und auf ein Kontroll SDS-Gel aufgetragen und Coomassiegefärbt (3.3.4, 3.6.12). Das Präzipitat wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt und ebenfalls auf ein SDS-Gel aufgetragen. Durch den Stromfluss wurden die Proteine vom Resin elektroeluiert und liefen ins Gel ein (3.3.4).

### **3.6.12 Anfärben von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue**

#### **Materialien:**

Färbelösung:	0,15% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250; 50% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
Entfärber:	30% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure

**Durchführung:**

SDS-Gele wurden durch Schütteln in Färbelösung 15 bis 60 Minuten gefärbt und anschließend im Entfärber entfärbt. Das Gel wurde zur Dokumentation photographiert.

**3.6.13 Silberfärbung von Proteingelen nach Blum et al., 1987**

Diese Färbung wurde in der Regel im Anschluss an eine Coomassiefärbung durchgeführt. Die Fixierungslösung entfärbt die Coomassie-gefärbten Proteine vollständig.

**Materialien:**

Fixierungslösung:	50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure
Lösung 1:	50% (v/v) Ethanol
Lösung 2:	30% (v/v) Ethanol
Lösung 3:	0,8 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Silberfärbelösung:	2 g/l AgNO <sub>3</sub> ; 0,026% Formaldehyd
Entwickler:	60 g/l Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 0,0185% Formaldehyd, 16 µM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
A. bid.	

**Durchführung:**

Das (Coomassie-gefärbte) Gel wurde mindestens o/n, besser 24 Stunden in Fixierungslösung inkubiert, um die Proteine im Gel zu fixieren. Danach wurde 2x in Lösung 1 und 1x in Lösung 2 für je 20 Minuten gewaschen. Das Gel wurde dann für genau 60 sec in Lösung 3 inkubiert und sofort danach in A. bid 3x 20 Minuten gewaschen. Nach 1 Stunde Inkubation in der Silberfärbelösung wurde die Entwicklerlösung zum Gel gegeben und solange inkubiert, bis eine optimale Färbung erreicht war. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 2x in A. bid für 20 Minuten gewaschen und anschließend das Gel wieder in die Fixierungslösung gegeben. Das Gel wurde zur Dokumentation photographiert. Dies musste rasch passieren, da nach 2 bis 3 Stunden Flecken auf dem Gel auftraten.

**3.6.14 Anfärben von Proteinen mit SimplyBlue™ SafeStain**

Das nicht-fixierende Anfärben von Proteingelen erfolgte über SimplyBlue™ SafeStain Kit der Firma Invitrogen entsprechend der Anleitung des Herstellers.

### 3.7 Reinigung von Transkriptionsfaktoren des humanen Polymerase III Systems

#### 3.7.1 *Reinigung von Proteinfractionen über Niederdruck-Chromatographie (Liquid Chromatography, LC), Phosphocellulose*

##### **Materialien:**

Phosphocellulose P 11	
Phosphocellulose-Puffer:	20 mM Hepes (pH 7,9); 100 mM KCl; 3 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 10% (v/v) Glycerin
Transkriptionspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,9; 10% (v/v) Glycerin; 60 mM KCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 3 mM DTT; 0,2 mM PMSF

##### **Durchführung:**

Die Phosphocellulose (Whatman P 11) musste vor Gebrauch in die Na<sup>+</sup>-Form gebracht (Schwartz et al., 1974) und anschließend mit 5-10 Säulenvolumina (SV) Phosphocellulose (PC)-Puffer äquilibriert werden. Für die nach Segall et al. (1980) beschriebene Separation der menschlichen Transkriptionsfaktoren IIIA, IIIB und IIIC durfte eine Beladung von 10 mg Protein pro ml Säulenbett nicht überschritten werden. Da jedoch etwa 50% der Proteine im Durchbruch (PCA) erschienen, konnte die Beladungskapazität auf 20 mg/ml Bettvolumen erhöht werden. Der Auftrag des Zellextraktes erfolgte nach Dialyse gegen Phosphocellulosepuffer auf die Säule mit 0,5 Säulenvolumen pro Stunde. Die Durchbruchfraktion wurde mit 100 mM KCl gewaschen, bis die Nulllinie des an eine UV-Einheit (280nm) angeschlossenen Schreibers erreicht war. Anschließend wurden die anderen Fraktionen mit 350 mM (PCB), 600 mM (PCC) und 1 M KCl (PCD) eluiert. Das Proteinprofil wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Alle Fraktionen wurden gegen 60 mM KCl Transkriptionspuffer dialysiert (3.6.3).

#### 3.7.2 *Reinigung von Proteinfractionen über Mitteldruck-Chromatographie*

Die Mitteldruckchromatographien wurden an einem Äkta Purifier von Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt.

### 3.7.2.1 Anionentauscher

#### Materialien:

Säulenmaterialien	EMD-DEAE-Fractogel 650S (EDF) MonoQ (1 ml bzw. 8 ml Fertigsäule) MiniQ (0,7 ml Fertigsäule)
Transkriptionspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,9; 10% (v/v) Glyzerin; 60 mM bzw. 1M KCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 3 mM DTT; 0,2 mM PMSF

#### Durchführung:

Die Säule wurde mit 4-6 Säulenvolumina äquiliбриert. Es wurden maximal 10 mg Proteinfraction pro ml Säulenbett aufgetragen. Danach wurde je nach Anwendung mit einem Salzgradienten oder mit mehreren Salzschrirten eluiert. Die Flussrate war abhängig von der Größe der Säule und von dem anfallenden Druck. Gradienten wurden fraktioniert gesammelt. Die vollständige Elution der auf der Säule verbliebenen Proteine erfolgte mit 1 M KCl.

### 3.7.2.2 Kationentauscher

#### Materialien:

Säulenmaterialien:	EMD-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Fractogel 650S (ESF) 1 ml bzw. 7 ml MonoS (1 ml Fertigsäule) MiniS (0,7 ml Fertigsäule)
Transkriptionspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,9; 10% (v/v) Glyzerin; 60 mM bzw. 1M KCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 3 mM DTT; 0,2 mM PMSF

#### Durchführung:

Die Säule wurde mit 4-6 Säulenvolumina äquiliбриert. Es wurden maximal 10 mg Proteinfraction pro ml Säulenbett aufgetragen. Danach wurde je nach Anwendung mit einem Salzgradienten oder mit mehreren Salzschrirten eluiert. Die Flussrate war abhängig von der Größe der Säule und von dem anfallenden Druck. Gradienten wurden fraktioniert gesammelt. Die vollständige Elution der auf der Säule verbliebenen Proteine erfolgte mit 1 M KCl.

### 3.7.2.3 Gelfiltration, „Size Exclusion Chromatography“ (SEC)

#### Materialien:

Chromatographiesäulen	Superdex 200 (HR 10/30 (analytisch)) Superdex 200 (XK 16/70 (präparativ))
Standardproteingemisch:	bestehend aus Dextranblau, BSA und Cytochrom C
Transkriptionspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,9; 10% (v/v) Glycerin; 60 mM / 200 mM KCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 3 mM DTT; 0,2 mM PMSF

#### Durchführung:

Proteine wurden nach ihrer Größe getrennt durch Gelfiltration (Size Exclusion Chromatographie (SEC)). Die Säule wurde vor Gebrauch mehrere Stunden mit Transkriptionspuffer äquilibriert. Dann wurden maximal 200 µl (analytisch) bzw. 2 ml (präparativ) der zu analysierenden Fraktion aufgetragen und Fraktionen von 1 ml (analytisch) bzw. 1 ml / 2 ml (präparativ) gesammelt. Das Ausschlussvolumen und die Größe der zu erwartenden Proteine in den Fraktionen wurde in Eichläufen durch Standardproteine ermittelt (Dextranblau, BSA und Cytochrom C).

### 3.7.2.4 Reinigung von rekombinantem TBP über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose

Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose ist aufgrund des immobilisierten Nickels in der Lage, Proteine zu komplexieren, die in ihrer Sequenz mehrere aufeinanderfolgende Histidine besitzen. Diese Methode wird zur Reinigung rekombinanter Proteine mit N- oder C-terminalem His-tag angewendet.

#### Materialien:

Säulenmaterial:	Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose
Puffer:	20 mM Hepes; 10% Glycerin; 750 mM KCl; 0,2 mM PMSF; 20 mM / 100 mM / 250 mM Imidazol

#### Durchführung:

Der TBP-haltige Bakterienüberstand (3.6.5) wurde mit der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose und 20 mM Imidazol (Blocken) für 2 Stunden im Kühlraum inkubiert. Anschließend wurde das Material in eine Säule überführt und mit 10 SV Puffer (20 mM Imidazol) gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden in zwei

Schritten mit 100 mM bzw. 250 mM Imidazol-Puffer von der Säule eluiert, was auf einer Verdrängung des Histidins von  $\text{Ni}^{2+}$  durch Imidazol beruht. TBP eluierte mit 100 mM Imidazol. Diese Fraktion wurde im Anschluss gegen 1x Transkriptionspuffer (3.8.1) dialysiert (3.6.3).

### **3.7.2.5 Single stranded DNA-Cellulose (ssDNA-Cellulose)**

Die 1-2 ml Säule wurde mit 4-6 Säulenvolumina äquilibriert. Es wurden maximal 10 mg Proteinfraction pro ml Säulenbett aufgetragen. Danach wurde mit mehreren Salzschriften eluiert. Die Flussrate betrug 0,25 ml/min. Die vollständige Elution der auf der Säule verbliebenen Proteine erfolgte mit 1 M KCl.

### **3.7.3 Präparation der Pol III Transkriptionsfaktoren**

Zytoplasmatische Zellextrakte oder Zellkernextrakte wurden durch Phosphocellulose-Chromatographie in die Fraktionen PCA (Durchbruch, 100 mM), PCB (350 mM), PCC (600 mM) und PCD (1M KCl) getrennt (3.7.1). Der Transkriptionsfaktor IIIA zeigt unterschiedliche chromatographische Eigenschaften und findet sich sowohl im Durchbruch (PCA) wie auch in der PCD. Die Transkriptionsfaktoren TFIIIB $\alpha$ , TFIIIB $\beta$ , TFIIIC1' sowie ein Teil der Polymerase III eluieren in der PCB. In der PCC eluieren die Transkriptionsfaktoren TFIIIC1, TFIIIC2, TFIIIC1<sub>like</sub>, TBA, TFIIIU, PBP sowie ebenfalls Polymerase III. Um die Transkriptionsfaktoren kreuzkontaminationsfrei darzustellen, wird mindestens ein weiterer Chromatographieschritt benötigt.

#### **3.7.3.1 Weitere chromatographische Trennung der PCB- und PCC-Fractionen**

Die Standardauftrennung der PCB erfolgte über eine 27 ml EDF-Säule (3.7.2.1). Die PCB wurde gegen 1x Transkriptionspuffer dialysiert aufgetragen und mit einem 200 ml-Gradienten von 60-450 mM KCl eluiert. 40 Fraktionen von 5 ml wurden aufgefangen. TFIIIB $\alpha$  eluierte mit ca. 150-170 mM, TFIIIB $\beta$  mit 280-300 mM und Polymerase III mit 350 mM KCl (Teichmann und Seifart, 1995). TFIIIC1' koeluiert mit TFIIIB $\beta$  (Meißner et al., 2002).

Die Standardreinigung der PCC erfolgte über eine 8 ml MonoQ-Säule (3.7.2.1). Die PCC wurde gegen 1x Transkriptionspuffer dialysiert aufgetragen und mit einem 160 ml Gradienten von 60-450 mM KCl eluiert. 40 Fraktionen von 4 ml



wurden aufgefangen. TFIIIC0 eluierte mit 160 mM KCl (diese Fraktion enthält die Aktivitäten TFIIIU, TBA und TFIIIC1like), TFIIIC1 mit 260 mM, PBP mit 300 mM und TFIIIC2 mit 370 mM KCl (Yoshinaga et al., 1987, Oettel et al., 1997, Oettel et al., 1998). Die Fraktionen wurden entweder weiter gereinigt oder gegen 1x Transkriptionspuffer dialysiert (3.6.3).

Für das Transkriptionssystem des U6 snRNA Gens wurden die MQ-TFIIIC1- bzw. die MQ-PBP-Fraktionen vereinigt, mit Transkriptionspuffer ohne KCl auf 200 mM bzw. 250 mM KCl verdünnt und jeweils auf eine 1 ml MonoQ-Säule (3.7.2.1) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem 20 ml Gradienten von 200-400 mM KCl bzw. von 250-450 mM KCl. Diese Re-Chromatographie über MonoQ (ReMQ) führte zu TFIIIC1 Fraktionen, die PBP-kreuzkontaminationsfrei waren, bzw. zu PBP Fraktionen, die TFIIIC1-kreuzkontaminationsfrei waren.

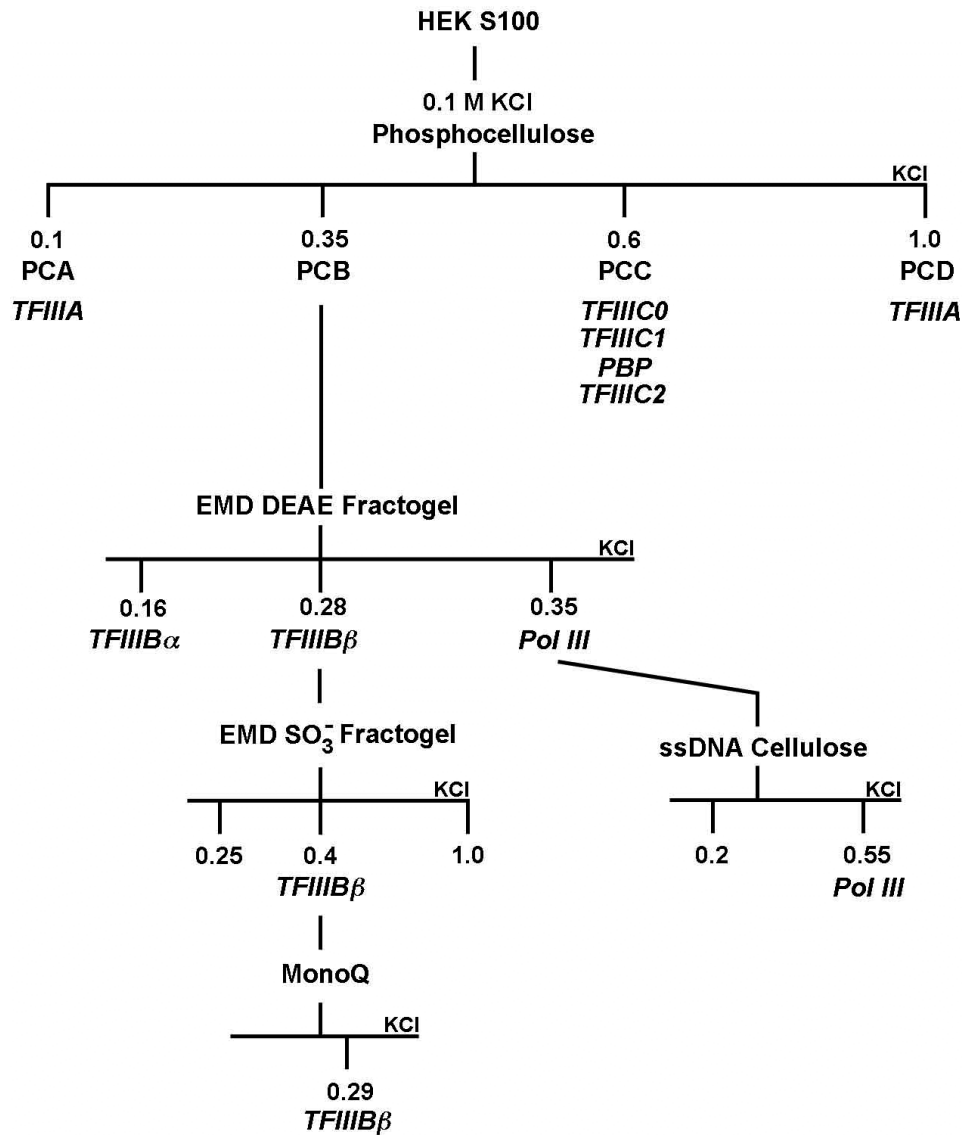
### **3.7.3.2 Präparation von TFIIIB $\beta$ und Polymerase III**

Die TFIIIB $\beta$ -Fraktionen aus dem EDF-Lauf (3.7.3.1) wurden vereinigt und mit Transkriptionspuffer ohne KCl verdünnt, bis die KCl Konzentration bei etwa 150-200 mM KCl lag. Dann wurde die Fraktion auf eine 7 ml Fractogel SO<sub>3</sub>-Säule (ESF, 3.7.2.2) aufgetragen und mit 250 mM, 400 mM und 1 M KCl eluiert. Die TFIIIB $\beta$ -Aktivität eluierte in der 400 mM Fraktion. Die Aktivität TFIIIC1', welche auf EDF-Ebene mit TFIIIB $\beta$  koeluiert, wird über die ESF-Chromatographie von TFIIIB $\beta$  abgetrennt, indem TFIIIC1' mit 450-500 mM KCl von der ESF-Säule eluiert (Meißner et al., 2002).

Für die weitere Reinigung wurde die ESF-TFIIIB $\beta$  Fraktion mit Transkriptionspuffer ohne KCl auf 200 mM KCl verdünnt und auf eine MonoQ-Säule (3.7.2.1) geladen. Die Elution erfolgte über einen 80 ml Gradienten von 200-350 mM KCl. Es wurden 20 Fraktionen von 4 ml gesammelt. Die TFIIIB $\beta$  Aktivität eluierte mit 290 mM KCl. Sie war frei von Polymerase III- sowie TFIIIC1- und TFIIIC2-Aktivitäten. Danach erfolgte eine Dialyse gegen 1x Transkriptionspuffer (3.6.3). Gegebenenfalls wurde TFIIIB $\beta$  direkt nach der EDF-Chromatographie über die MonoQ-Säule gereinigt. In diesem Fall konnte TFIIIB $\beta$  (MonoQ: 280-300 mM KCl) ebenfalls von der TFIIIC1' Aktivität (MonoQ: 200-250 mM KCl) getrennt werden (Weser et al., 2003).

Die Polymerase Fraktionen aus dem EDF Lauf (3.7.3.1) wurden vereinigt und mit Transkriptionspuffer ohne KCl auf 150 mM KCl verdünnt und auf 1-2 ml

single stranded (ss) DNA Zellulose-Säule (3.7.2.5) geladen. Die Elution erfolgte in zwei Schritten mit 200 mM und 550 mM KCl, wobei die Polymerase in der 550 mM KCl Fraktion eluierte. Diese Fraktion war frei von jeglicher Kreuzkontamination und wurde mit Glycerin auf eine Endkonzentration von ca. (50% v/v) verdünnt und portioniert à 30 µl bei -80°C weggefroren.



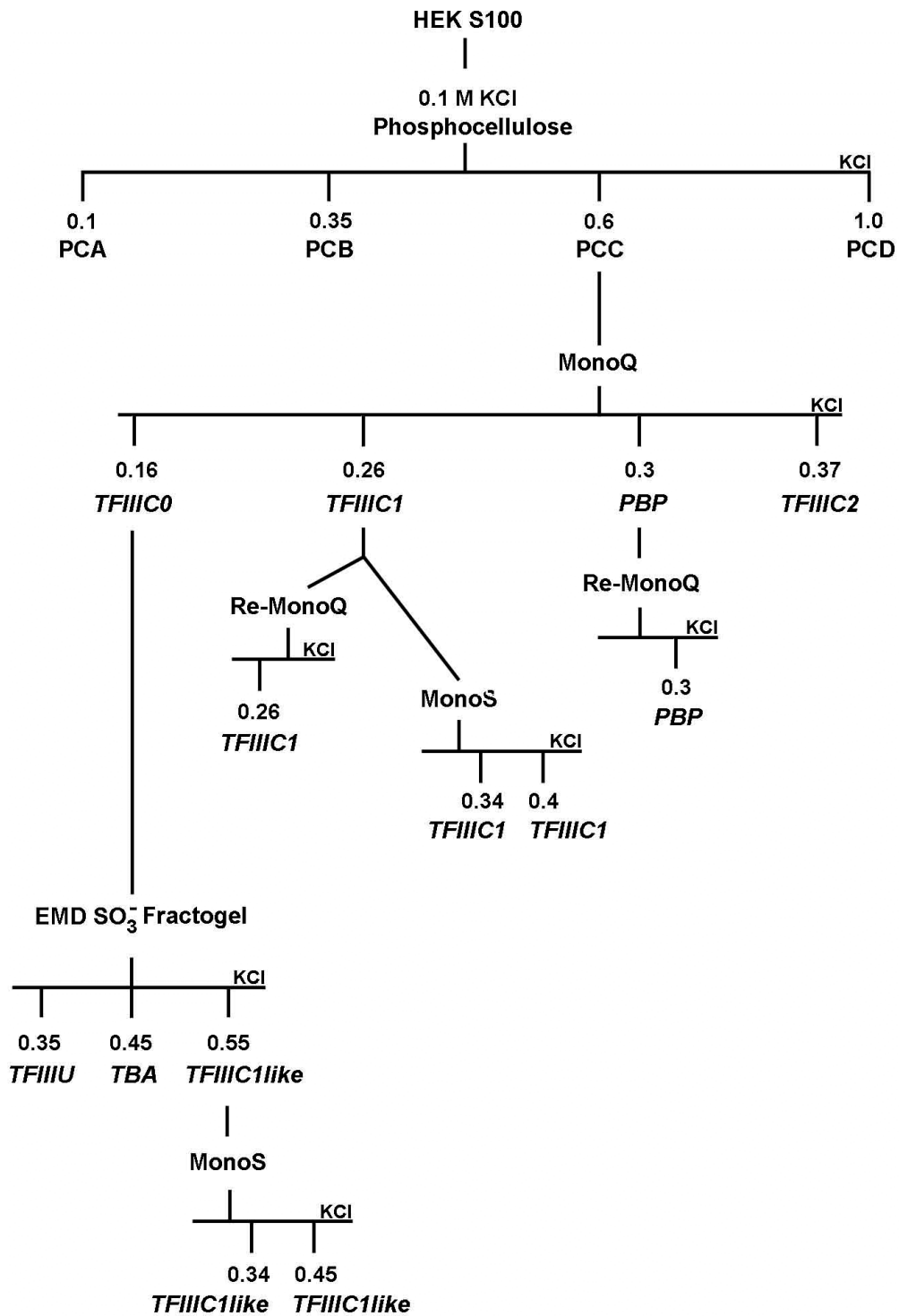
Übersicht 3: Chromatographieschema für die Reinigung von TFIIIBα, TFIIIBβ und Pol III

### **3.7.3.3 Präparation von TFIIU aus der TFIIIC0-Fraktion**

Die TFIIIC0 Fraktionen aus dem MonoQ-Lauf (3.7.3.1) wurden vereinigt, mit Transkriptionspuffer ohne KCl auf 200 mM KCl verdünnt, auf eine 1 ml ESF-Säule (3.7.2.2) geladen und mit einem 20 ml Gradienten von 200-600 mM KCl eluiert. Es wurden 20 Fraktionen von 1 ml gesammelt. TFIIU eluierte mit 300-380 mM KCl. Somit wird TFIIU von der ebenfalls in der TFIIIC0-Fraktion enthaltenen Aktivität TFIIIC1like abgetrennt (TFIIIC1like eluiert von der ESF mit 500-550 mM KCl). Die weitere Reinigung der ESF-TFIIU Aktivität erfolgte über eine analytische Gelfiltration (3.7.2.3) mit 60 mM KCl im Laufpuffer.

### **3.7.3.4 Reinigung von TFIIIC1 und TFIIIC1like über MonoS**

Die TFIIIC1 Fraktionen des MonoQ-Laufs (3.7.3.1) wurden vereinigt, mit Transkriptionspuffer ohne KCl auf 200 mM KCl verdünnt und auf die MonoS-Säule (3.7.2.2) geladen. Die Elution erfolgte mit einem 30 ml Gradienten von 200-600 mM KCl. Es wurden 30 Fraktionen von 1 ml gesammelt. TFIIIC1<sub>low</sub> eluierte mit 340 mM KCl und TFIIIC1<sub>high</sub> mit 400 mM KCl. Unter den gleichen Bedingungen wurde TFIIIC1like (MQ-TFIIIC0 Fraktionen) gereinigt. Dabei eluierte TFIIIC1like<sub>low</sub> mit 350 mM KCl und TFIIIC1like<sub>high</sub> mit 450 mM KCl.



Übersicht 4: Chromatographieschema für die Reinigung von TFIIU, TBA, TFIIIC1like, TFIIIC1, PBP und TFIIIC2

### **3.7.3.5 Weitere Reinigung von TFIIIC1<sub>low</sub> und TFIIIC1<sub>high</sub> über MiniS**

Die MonoS (3.7.3.4) Fraktionen der TFIIIC1<sub>low</sub> Aktivität oder die MonoS Fraktionen der TFIIIC1<sub>high</sub> Aktivität wurden vereinigt, mit Transkriptionspuffer ohne KCl auf 300 mM KCl verdünnt und auf die MiniS Säule (3.7.2.2) geladen. Die Elution erfolgte mit einem 30 ml Gradienten von 300-600 mM KCl. Es wurden 30 Fraktionen von 1 ml gesammelt. TFIIIC1<sub>low</sub> eluierte mit 400-450 mM KCl und TFIIIC1<sub>high</sub> mit 480-550 mM KCl.

### **3.7.3.6 Weitere Reinigung von TFIIIC1<sub>low</sub> und TFIIIC1<sub>high</sub> bzw. von TFIIIC1like<sub>low</sub> und TFIIIC1like<sub>high</sub> über MiniQ**

Die MonoS (3.7.3.4) Fraktionen der TFIIIC1<sub>low</sub> Aktivität oder die MonoS Fraktionen der TFIIIC1<sub>high</sub> Aktivität wurden vereinigt, mit Transkriptionspuffer ohne KCl auf 100 mM KCl verdünnt und auf die MiniQ Säule (3.7.2.1) geladen. Die Elution erfolgte mit einem 20 ml Gradienten von 100-300 mM KCl. Es wurden 20 Fraktionen von 1 ml gesammelt. Sowohl TFIIIC1<sub>low</sub> wie auch TFIIIC1<sub>high</sub> eluierten mit 220 mM KCl von der MiniQ. Die weitere Reinigung der beiden MiniQ-TFIIIC1 Aktivitäten erfolgte über Gelfiltration (3.7.2.3) mit 200 mM KCl im Laufpuffer.

Die MiniQ-Chromatographie mit den beiden MonoS-TFIIIC1like Aktivitäten wurde unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt. Hier wurden die vereinigten MonoS Fraktionen auf 60 mM KCl verdünnt bevor sie auf die Säule geladen wurden. TFIIIC1like<sub>low</sub> wie auch TFIIIC1like<sub>high</sub> eluierten mit 120 mM KCl von der MiniQ.

## **3.8 *In vitro* Transkription**

### **3.8.1 Spezifische *in vitro* Transkription**

Die zellfreie spezifische *in vitro* Transkription an klonierten Genen stellt ein Testsystem zum Nachweis und zur Charakterisierung von Transkriptionskomponenten dar. Zudem ermöglicht sie die Analyse der Abfolge einzelner Abschnitte des Transkriptionszyklus *in vitro*. Ein Transkriptionsansatz enthielt alle notwendigen Proteinkomponenten (Polymerasen, Transkriptionsfaktoren),

Matrizen-DNA sowie Nukleotide. Die radioaktive Markierung der synthetisierten RNA erfolgt durch Einbau von ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ )GTP in die wachsende RNA-Kette.

**Materialien:**

Transkriptionspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,9; 10% (v/v) Glycerin; 60 mM KCl; 5 mM $\text{MgCl}_2$ ; 3 mM DTT; 0,2 mM PMSF; (Puffer ohne KCl diene zum Salzausgleich entsprechender Proteinproben)
EDTA	5 mM
Plasmid-DNA	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Proteinase-K Mix:	0,4 mg/ml Proteinase K; 100 mM Tris/HCl, pH 7,9; 20 mM EDTA; 2% SDS; 0,2 mg/ml tRNA
NTP-Mix für Pol III	10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM UTP und 0,5 mM GTP in 67 mM Tris, pH 7,9
( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ )-GTP	10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$
RNAse Block Ribonuclease Inhibitor	40 U/ $\mu\text{l}$

Ein typischer ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ )-GTP markierter Transkriptionsansatz enthält:

NTP Mix für Pol III	5 $\mu\text{l}$
( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ )-GTP	0,3 $\mu\text{l}$
Plasmid-DNA	0,5 $\mu\text{l}$
EDTA	1 $\mu\text{l}$
RNAse Block	0,5 $\mu\text{l}$
Transkriptionspuffer	ad. 50-90 $\mu\text{l}$

**Durchführung:**

Zunächst wurden die Reaktionsansätze im Eiswasserbad bei 0°C erstellt. Das Volumen betrug, sofern nicht anders angegeben, 50-90  $\mu\text{l}$ . Proteinfractionen, DNA, Nukleotide, EDTA RNAse Block und Puffer wurden zusammengegeben und anschließend bei 30°C für 90 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde abgestoppt durch Zugabe von Proteinase-K Mix ad. 100-150  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen. Danach wurde der Ansatz 15-30 min bei RT weiterinkubiert. Anschließend wurde die synthetisierte RNA isoliert (3.8.2) und gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.3.2) Das Gel wurde autoradiographiert (3.9.1) bzw. die erhaltenen Signale durch einen Phosphor Imager quantifiziert (3.9.2).

### **3.8.2 Aufarbeitung von RNA aus *in vitro* Transkriptionsansätzen**

#### **Materialien:**

PCI:	Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (50/50/1)
Denaturierungslösung:	0,2% Bromphenolblau; 0,2% Xylencyanol in 80% (v/v) Formamid
Natriumacetat-Lösung:	0,6 M Natriumacetat, pH 5,5
Ethanol.	100%

#### **Durchführung:**

Die in der *in vitro* Transkription synthetisierte RNA (3.8.1) wurde mit 100 µl Natriumacetatlösung versehen, um die Fällung der Nukleinsäuren vorzubereiten. Als Fällungshilfe diente die im Proteinase-K Mix enthaltene tRNA. Dann wurden 100 µl PCI hinzugegeben, um Proteine und deren Abbauprodukte abzutrennen. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 13000 UpM wurde die wässrige Phase abgezogen und in 2,5 VT 100% Ethanol überführt. Die Pelletierung der RNA erfolgte durch 20 minütige Zentrifugation bei 13000 UpM. Nach dem Abziehen des Ethanols wurde das Sediment in 10 µl Denaturierungslösung aufgenommen und 15-20 Minuten bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei 95°C denaturiert, im Eiswasserbad abgekühlt und auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetragen (3.3.2). Die Analyse des Gels erfolgte durch Autoradiographie (3.9.1) und gegebenenfalls auch durch Auswertung am Phosphor Imager (3.9.2).

## **3.9 Bestimmung radioaktiver Strahlung**

### **3.9.1 qualitativ durch Autoradiographie**

Nach gelelektrophoretischer Trennung radioaktiv markierter Nukleinsäuren wurde das Gel oder die Membran mit handelsüblicher Frischhaltefolie überzogen und ein Röntgenfilm sowie eine Verstärkerfolie („intensifying screen“) aufgelegt. Der Film wurde in lichtundurchlässiger Verpackung 1-8 Tage bei -80°C exponiert. Nach Entwicklung und Fixierung des Films erscheinen die markierten RNA Fragmente als geschwärzte Banden.

### **3.9.2 qualitativ und quantitativ mittels Analyse durch einen Phosphor Imager**

Mit Hilfe dieser Methode kann die Stärke der radioaktiven Strahlung der verschiedenen Proben in kurzer Zeit sehr exakt ermittelt werden. Vor dem Auflegen werden alte Daten, die noch auf der Imaging Plate (IP) gespeichert sind, in einem "Eraser" gelöscht, und diese nun informationsleere IP auf das Gel aufgelegt. Die Expositionsdauer beträgt nur ca.  $\frac{1}{10}$  der Zeit, die ein Röntgenfilm benötigt.

Die IP wird nach der Exposition in einem Fuji FLA -3000 Fluorescent Image Analyzer / Phosphor Imager gescannt (mit dem Programm "Image Reader V. 1.7 E"), d.h. die genaue Signalstärke wird ermittelt. Die Auswertung der gespeicherten Daten erfolgt mit Hilfe eines Computers mit dem Programm "Science Lab 98, Image Gauge, Version 3.1".



## 4 Ergebnisse

Im Gegensatz zur Hefe existiert im humanen Polymerase III System neben den beiden genintern gelegenen Promotortypen (Typ 1 und Typ 2) ein genexterner, 5'-gelegener Promotortyp (Typ 3). Neben einem unterschiedlichen Bedarf an primär Promotor-erkennenden Transkriptionsfaktoren benötigen diese Promotortypen auch unterschiedliche TFIIIB Aktivitäten. TFIIIB $\alpha$  wird für die Transkription der genextern regulierten Gene benötigt und TFIIIB $\beta$  für die der genintern regulierten Gene.

Die TFIIIB Aktivität der Hefe besteht aus den drei Komponenten yTBP, yBrf1 und yBdp1. Über die Zusammensetzung der humanen TFIIIB Aktivitäten waren lange Zeit folgende Daten bekannt:

- Die zur Hefe homologen Proteine hTBP und hBrf1 konnten analog zu yTFIIIB als Bestandteile der TFIIIB $\beta$  Aktivität des humanen Systems nachgewiesen werden, wobei hTBP und hBrf1 einen stabilen TBP-TAF Komplex bilden.
- Die TFIIIB $\alpha$  Aktivität repräsentiert dagegen keinen TBP-TAF Komplex. Dennoch wird für die *in vitro* Transkription der 5'-regulierten Gene die Zugabe von freiem hTBP, aber nicht von hBrf1, benötigt.

2000 wurde berichtet, dass ein 150-160 kDa Protein als humanes Homolog zu yBdp1 gefunden worden ist, welches funktionell als genereller Pol III Transkriptionsfaktor charakterisiert wurde (Schramm et al., 2000; M. Teichmann, persönliche Mitteilung). Außerdem gilt das zu Brf1 homologe 50 kDa Protein Brf2, welches als Bestandteil der U6 spezifischen TFIIIU Fraktion nachgewiesen werden konnte (Gruber, 2000), als spezifischer Transkriptionsfaktor der 5'-regulierten Gene (Schramm et al., 2000; Teichmann et al., 2000). Trotz der bestehenden Homologie zwischen Brf1 und Brf2 können sich die beiden Proteine funktionell nicht ersetzen. Somit bilden im humanen System Brf1 und Brf2 die promotorspezifischen Komponenten der TFIIIB $\beta$  und TFIIIB $\alpha$  Aktivitäten, während laut Schramm und Teichmann TBP und Bdp1 die

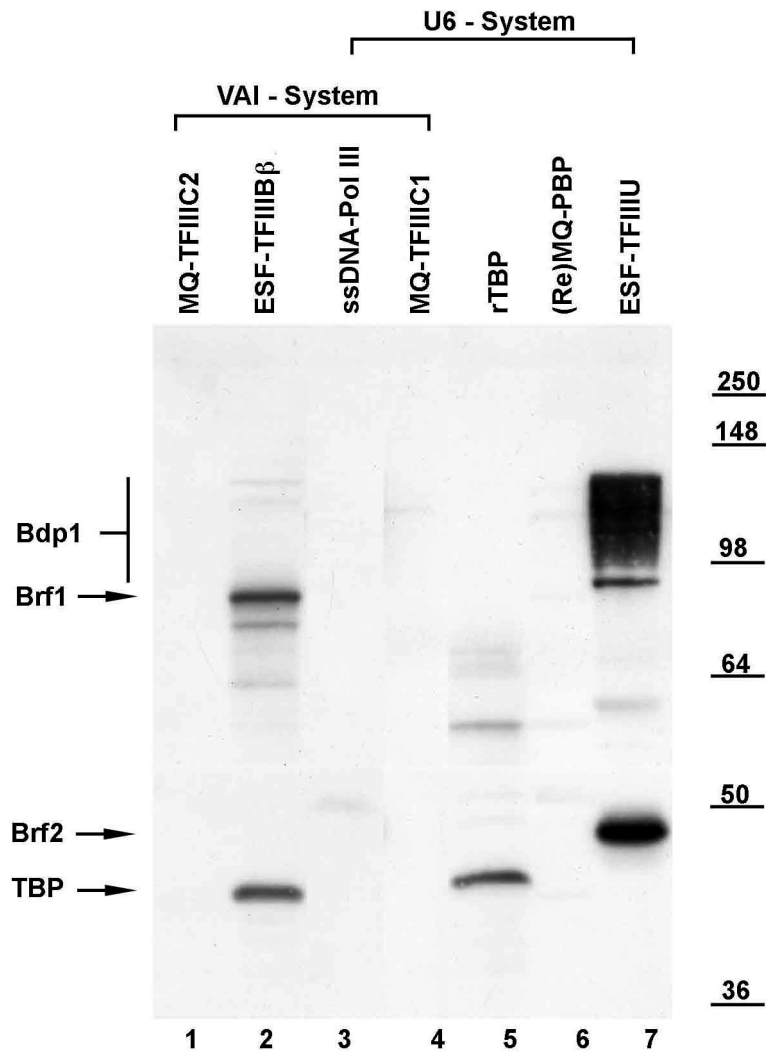
gemeinsamen Komponenten darstellen (Schramm et al., 2000; Teichmann et al., 2000).

Interessanterweise konnte M. Teichmann beobachten, dass Proteine mit unterschiedlichen molekularen Massen (ca. 97-150 kDa) mit dem Bdp1 Antikörper reagierten, welche möglicherweise verschiedene Formen posttranslationaler Modifizierungen darstellen. (M. Teichmann, persönliche Mitteilung).

#### **4.1 Untersuchungen zur Funktion von hBdp1**

##### ***4.1.1 Analyse der VAI- und U6 Transkriptionssysteme im Hinblick auf Bdp1***

Da Bdp1 als essentieller Transkriptionsfaktor für genintern sowie 5'-regulierte Gene beschrieben war, sollte überprüft werden, ob und in welchen der Fraktionen eines von uns typisch verwendeten rekonstituierten Transkriptionssystems eine funktionelle Form von Bdp1 enthalten ist. Daher wurde eine Western Blot Analyse aller für die VAI (Typ 2)- und U6 (Typ 3)-Transkription benötigten Fraktionen von gereinigten Transkriptionsfaktoren im Hinblick auf Bdp1 durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurde unserem Labor freundlicherweise der Bdp1 Antikörper von Dr. M. Teichmann zur Verfügung gestellt. Die Abb. 1 zeigt diesen Western Blot, wobei die Fraktionen vollständig auch auf TBP, Brf1 und Brf2 untersucht worden sind. Mit TFIIC2, TFIIB $\beta$ , TFIIC1 und der Pol III repräsentieren die Bahnen 1-4 ein funktionell vollaktives VAI Transkriptionssystem, während rekombinantes TBP, PBP, TFIIU, TFIIC1 und die Pol III (Bahnen 3-7) ein effizient transkribierendes U6 Rekonstitutionssystem darstellen. TBP und Brf1 waren erwartungsgemäß in der TFIIB $\beta$  Fraktion (Bahn 2) nachweisbar. Zusätzlich erkannte der TBP Antikörper das rekombinante His-getaggte Protein in Bahn 5. Brf2 konnte ausschließlich in der TFIIU Fraktion detektiert werden. Der Bdp1 Antikörper detektierte eine große Anzahl von Proteinen zwischen 90 und 148 kDa in der TFIIU Fraktion. Die TFIIB $\beta$ , PBP und TFIIC1 Fraktionen enthielten kaum nachweisbare anti Bdp1 reaktive Proteine.



**Abb. 1: Western Blot: Test der rekonstituierten VAI- und U6-Systeme auf Bdp1, Brf1, Brf2 und TBP**

Bahn 1: 80  $\mu$ l MQ-TFIIIC2; Bahn 2: 80  $\mu$ l ESF-TFIIIB $\beta$ ; Bahn 3: 80  $\mu$ l ssDNA Zellulose Pol III; Bahn 4: 80  $\mu$ l MQ-TFIIIC1; Bahn 5: 20  $\mu$ l rTBP; Bahn 6: 80  $\mu$ l (Re)MQ-PBP; Bahn 7: 80  $\mu$ l ESF-TFIIU

10% SDS Trenngel; oberer Membranteil (bis 60 kDa): erste Inkubation mit anti Bdp1 Antikörper (1:400), zweite Inkubation mit anti Brf1 Antikörper (1:1000); unterer Membranteil (36-60 kDa): erste Inkubation mit anti Brf2 Antikörper (1:500), zweite Inkubation mit anti TBP Antikörper (1:400); Zweitantikörper für anti Bdp1, anti Brf1 und anti Brf2:  $^{125}$ I-markierter anti rabbit Antikörper (1 $\mu$ Ci/ml); Zweitantikörper für anti TBP:  $^{125}$ I-markierter anti mouse Antikörper (1 $\mu$ Ci/ml)

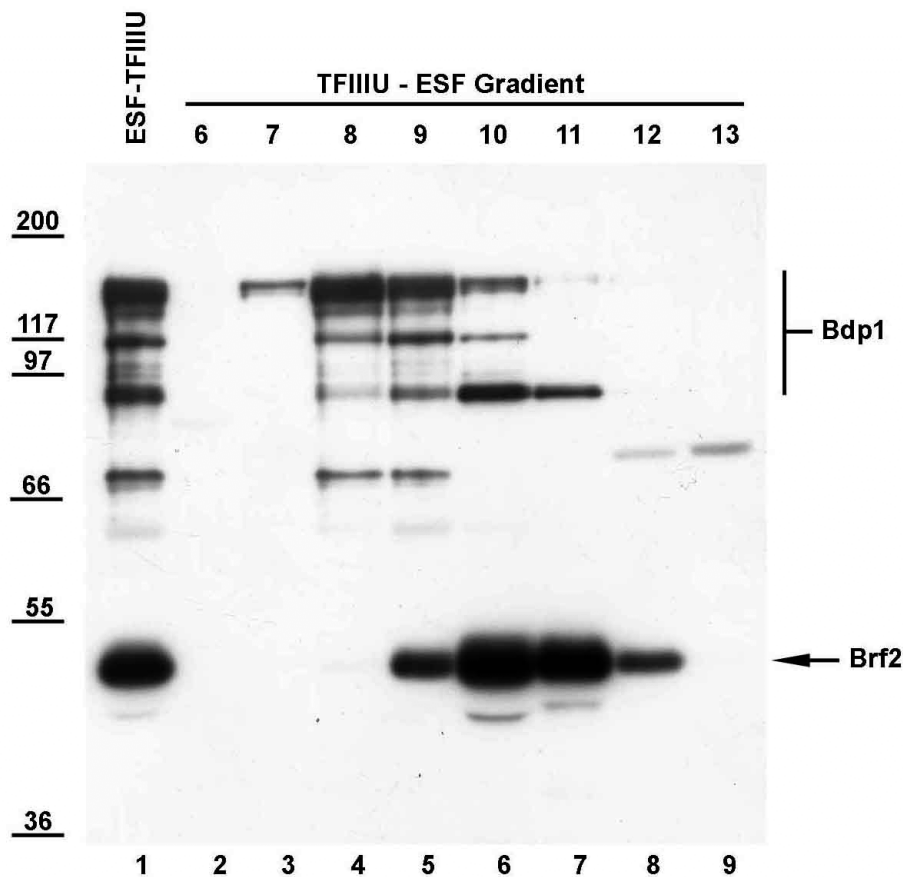
Sollten die Proteine der TFIIU Fraktion, welche von den Bdp1 Antikörpern erkannt worden sind, funktionelle Bdp1-Formen darstellen, konnte die von Schramm und Teichmann aufgestellte Hypothese, dass hBdp1 ein essentieller Transkriptionsfaktor ist, für den Fall der 5'-regulierten Gene von uns nachvollzogen werden.

Auffällig ist jedoch, dass das funktionell vollaktive Transkriptionssystem für intern regulierte Gene keine nennenswerten Mengen an anti Bdp1 reaktiven Proteinen enthielt. Außerdem konnte die Bdp1 Verunreinigung in der ESF-TFIIIB $\beta$  Fraktion durch einen weiteren MQ-Reinigungsschritt entfernt werden, wobei TBP und Brf1 in der Fraktion erhalten blieben (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise zeigte diese MQ-TFIIIB $\beta$  Fraktion funktionell die gleiche Aktivität, wie die ESF-TFIIIB $\beta$  Fraktion, was darauf schließen ließ, dass anti Bdp1 reaktive Proteine nicht für die Rekonstitution der TFIIIB $\beta$  Aktivität im hier verwendeten VAI System nötig waren. Wenn das der Fall ist, stellte sich zugleich die Frage, ob die anti Bdp1 reaktiven Proteine der TFIIIU Fraktion im U6 Transkriptionssystem funktionell sind oder nicht.

Um diese Frage beantworten zu können, sollte eine Fraktion präpariert werden, die neben Bdp1 keine der anderen Pol III spezifischen Transkriptionsaktivitäten enthält. Diese Präparation sollte anschließend an beiden Transkriptionssystemen, VAI und U6, auf ihren funktionellen Effekt *in vitro* getestet werden. Ausgangspunkt dafür sollte eine ESF-TFIIIU Fraktion sein, da diese Fraktion eine ganze Reihe von anti Bdp1 reaktiven Proteinen enthielt. Gegebenenfalls sollte so auch überprüft werden, welche dieser Proteine regulative Effekte zeigen und welche nicht. Außerdem weist die ESF-TFIIIU Fraktion weder TBP und Brf1 (Abb. 1) noch TFIIIC2, TFIIIC1, PBP bzw. Pol III Aktivität auf (Oettel et al., 1998). Somit lag die Hauptaufgabe darin, die anti Bdp1 reaktiven Proteine chromatographisch von Brf2 zu trennen. Diese Trennung würde zudem in einem Bdp1-freien U6 Transkriptionssystem resultieren, was für die funktionelle Analyse der potentiellen Bdp1 Proteine essentiell war.

Für dieses Vorhaben wurde eine MQ-TFIIIC0 Fraktion einer ESF Gradientenchromatographie unterzogen. Dabei wird die in der MQ-TFIIIC0 Fraktion enthaltende Aktivität TFIIIC1like (ESF<sub>0,5-0,55 M KCl</sub>) von TFIIIU (ESF<sub>0,35-0,4 M KCl</sub>) abgetrennt (Oettel et al., 1998). Die Western Blot Analyse des ESF Gradienten im Bereich der TFIIIU Aktivität (0,25-0,4 M KCl) mit Antikörpern gegen Brf2 und Bdp1 ist in der Abb. 2a zu sehen. Der Bdp1 Antikörper erkannte Proteine zwischen 60 und 150 kDa in den Fraktionen 7-13. Möglicherweise repräsentieren einige dieser Proteine diejenigen, welche auch M. Teichmann (97-150

kDa) mit diesem Antikörper detektieren konnte. Brf2 war in den Fraktionen 9-12 nachweisbar. Somit konnte beobachtet werden, dass ein ca. 90 kDa anti Bdp1 reaktives Protein in den Fraktionen 9-11 mit Brf2 koeluierte, während die größeren anti Bdp1 reaktiven Formen von Brf2 leichter abzutrennen waren.



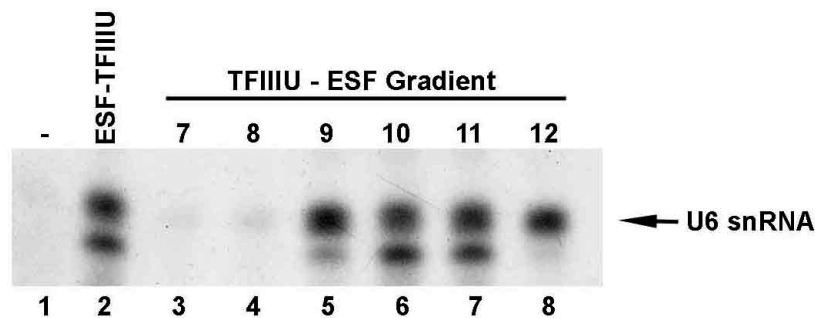
**Abb. 2a: Western Blot: Test eines ESF Gradienten im TFIIU Bereich (0,25-0,4 M KCl) auf den Gehalt an Brf2 und Bdp1**

Bahn 1: 80 µl ESF-TFIIU; Bahnen 2-9: 80 µl der Fraktionen 6-13 des ESF Gradienten im TFIIU-Elutionsbereich

10% SDS Trenngel; Membraninkubation des oberen Teils (bis 60 kDa) mit anti Bdp1 Antikörper (1:400), des unteren Teils (36-60 kDa) mit anti Brf2 Antikörper (1:500); Zweitantikörper:  $^{125}$ I-markierter anti rabbit Antikörper (1µCi/ml)

Eine funktionelle Analyse dieser ESF Fraktionen in einem U6 Transkriptionssystem, welches keine TFIIU Fraktion enthielt (Abb. 2b), zeigte, dass die Fraktionen 9-12 (0,3-0,38 M KCl) in der Lage waren, die U6 Transkription

funktionell zu rekonstituieren (Bahnen 5-8). Diese Fraktionen enthielten alle Brf2 (Abb. 2a). Die Zugabe der Fraktionen 10 und 11, welche die maximale Menge an Brf2 und der 90 kDa anti Bdp1 Form enthielten, resultierten in der für die U6 snRNA *in vitro* Transkription charakteristischen Doppelbande, die zwei spezifische U6 Transkripte repräsentiert, deren Entstehungsmechanismus bisher nicht bekannt ist (Teichmann und Seifart, 1995; Meißner et al., 1995; Stünkel et al., 1997).



**Abb. 2b: *In vitro* Transkription: Test eines TFIIU-ESF Gradienten auf U6 Transkriptionsaktivität**

Bahnen 1-8: 2 µl rTBP; 2,5 µl (Re)MQ-PBP; 20 µl (Re)MQ-TFIIIC1; 2 µl ss DNA Zellulose-Pol III; Bahn1 dient als TFIIU-freie Negativkontrolle; Bahn 2: 3 µl ESF-TFIIU (Positivkontrolle); Bahnen 3-8: 3 µl der ESF Fraktionen 7-12; Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUmU6.

#### **4.1.2 Vollständige Trennung von Brf2 und den anti Bdp1 reaktiven Proteinen über Superdex 200 Chromatographie**

Für eine effiziente Bdp1 / Brf2 Trennung erschien eine Trennung nach Größe per Gelfiltration (size exclusion chromatography) sinnvoll. Die Gelfiltrationen wurden bei 60 mM KCl mit Superdex 200 Material durchgeführt (3.7.2.3). Für die erste Gelfiltration sollten diejenigen ESF Fraktionen verwendet werden, welche den Hauptanteil an Brf2 enthielten (Fraktionen 10-12, Abb. 2a), und für eine zweite Gelfiltration diejenigen ESF Fraktionen, die den Hauptanteil an anti Bdp1 reaktiven Proteinen enthielten (Fraktionen 7-9, Abb. 2a).

Die dialysierten (60 mM KCl) ESF Fraktionen 10-12 bzw. 7-9 aus drei identischen TFIIU-ESF Gradienten stammend, wurden zunächst über einen MQ-Elutionsschritt (60-250 mM KCl) konzentriert. Für die anschließende

Superdex 200 (HR 10/30) Chromatographie wurden jeweils 200 µl der MQ-Euate verwendet. Die gesammelten 1 ml Fraktionen beider Gelfiltrationen wurden mit Antikörpern gegen Brf2 und Bdp1 einer Western Blot Analyse unterzogen. Die Abb. 3a zeigt diejenige Gelfiltration, die mit den ESF Fraktionen 10-12 durchgeführt wurde. Dabei stellt die Bahn 1 die zusammengefassten ESF Fraktionen dar. Die Superdex 200 Fraktionen 14-17 enthielten ausschließlich Brf2. Das 90 kDa anti Bdp1 reaktive Protein konnte in den Fraktionen 12 und 13 nachgewiesen werden, womit es chromatographisch von Brf2 getrennt werden konnte. Eine Komplexierung dieser Form mit Brf2 ist daher sehr unwahrscheinlich. Mit dieser Gelfiltration ist es gelungen, Brf2 Fraktionen zu präparieren, die frei von möglichen Bdp1-aktiven Proteinen sind.

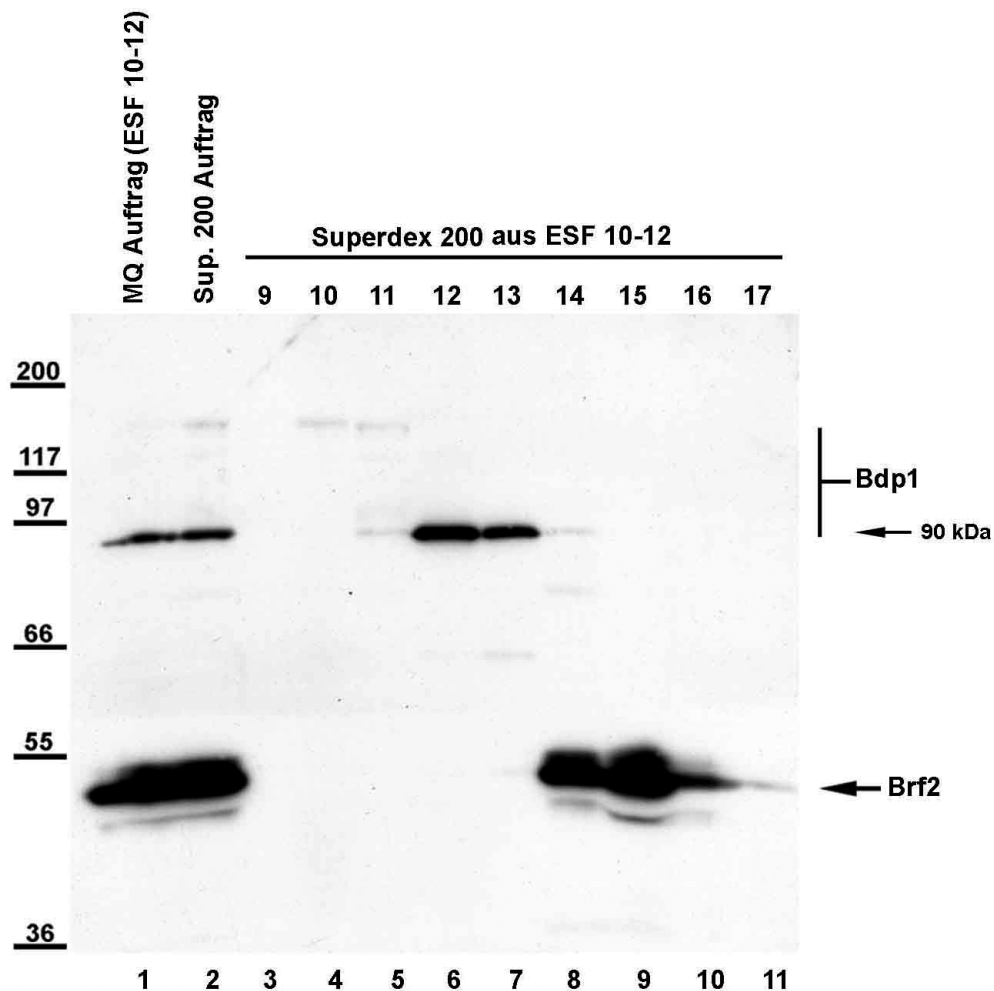


Abb. 3a: Western Blot: Untersuchung der Gelfiltration, die mit den ESF Fraktionen 10-12 durchgeführt wurde, auf Bdp1 und Brf2

Bahn 1: 80 µl ESF Fraktionen 10-12 (Abb.2a) als MQ Auftrag; Bahn 2: 20 µl MQ-konzentrierte Fraktion (0,25 M KCl) als Superdex 200 Auftrag; Bahnen 3-11: 400 µl der Superdex 200 Fraktionen 9-17

10% SDS Trenngel; Membraninkubation des oberen Teils (bis 60 kDa) mit anti Bdp1 Antikörper (1:400), des unteren Teils (36-60 kDa) mit anti Brf2 Antikörper (1:500); Zweitantikörper:  $^{125}$ I-markierter anti rabbit Antikörper (1µCi/ml)

Mit der Abb. 3b ist die Western Blot Analyse derjenigen Gelfiltration dargestellt, die mit den ESF Fraktionen 7-9 durchgeführt wurde. Sie zeigt, dass die größeren Bdp1 immunreaktiven Proteine (90-150 kDa) in den Fraktionen 9-12 eluierten und somit vollständig von Brf2 (Fraktionen 14 und 15) abgetrennt werden konnten. Damit entstanden aus dieser zweiten Gelfiltration Brf2-freie Fraktionen, die potentielle Bdp1 Proteine enthielten. Die Abtrennung der größeren anti Bdp1 reaktiven Proteine untereinander gelang nur unvollständig.

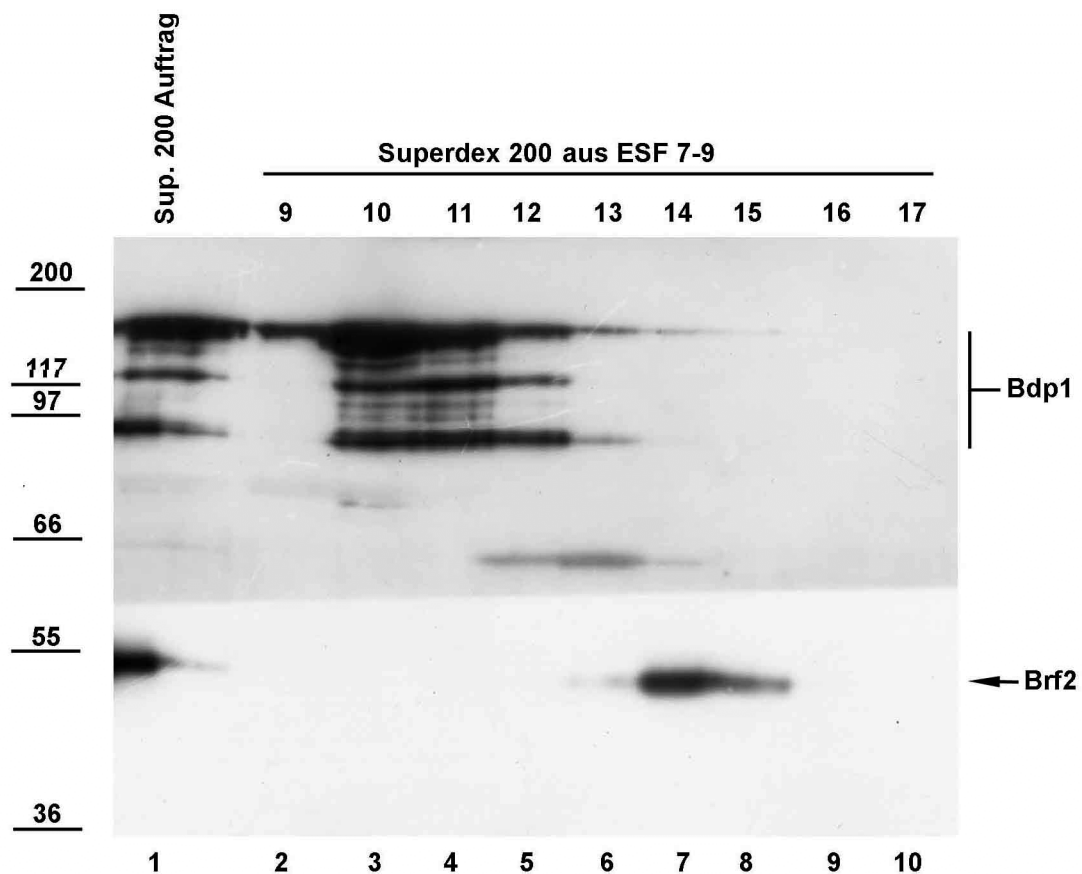


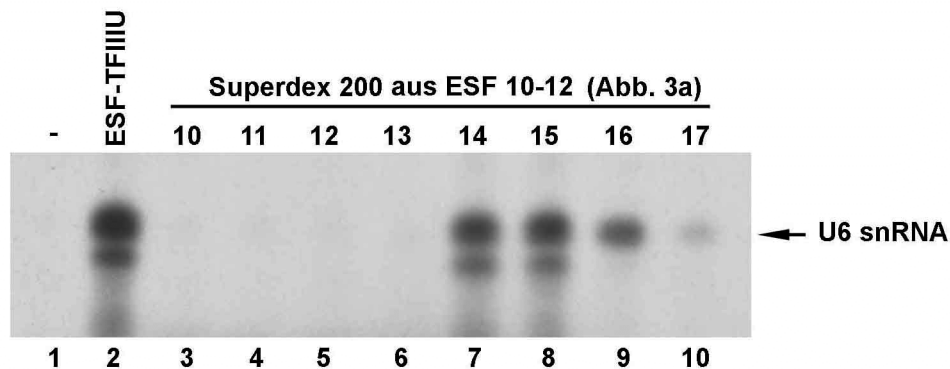
Abb. 3b: Western Blot: Untersuchung der Gelfiltration, die mit den ESF Fraktionen 7-9 durchgeführt wurde, auf Bdp1 und Brf2



Bahn 1: 20 µl MQ-konzentrierte Fraktion (0,25 M KCl) aus den ESF Fraktionen 7-9 (Abb. 2a) als Superdex 200 Auftrag; Bahnen 2-10: 400 µl der Superdex 200 Fraktionen 9-18

8% SDS Trenngel; Membraninkubation des oberen Teils (bis 60 kDa) mit anti Bdp1 Antikörper (1:400), des unteren Teils (36-60 kDa) mit anti Brf2 Antikörper (1:500); Zweitantikörper:  $^{125}$ I-markierter anti rabbit Antikörper (1 µCi/ml)

Die Superdex 200 Fraktionen beider Gelfiltrationen wurden in einem TFIID-freien U6 Transkriptionssystem, welches dem der Abb. 1 entspricht, auf funktionelle Aktivität getestet. Stellvertretend dafür zeigt die Abb. 4 die U6 *in vitro* Transkription der Gelfiltration aus den ESF Fraktionen 10-12 (Abb. 3a). Interessanterweise waren die Brf2 Fraktionen 14-17, die nachweislich kein Bdp1 enthielten, in der Lage die U6 Transkription zu rekonstituieren (Vergleich Abb. 3a Bahnen 8-11 und Abb. 4 Bahnen 7-10). Das gleiche Verhalten konnte beim funktionellen Testen der zweiten Gelfiltration (Abb. 3b) beobachtet werden. Hier transkribierten ebenfalls die Brf2-haltigen Fraktionen 14 und 15, nicht aber die Fraktionen 9-12, welche anti Bdp1 reaktive Proteine enthielten (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4: *In vitro* Transkription: Test der Superdex 200 Fraktionen aus Abb. 3a auf Transkriptionsaktivität am U6 Gen**

Bahnen 1-10: 2 µl rTBP; 2,5 µl (Re)MQ-PBP; 20 µl (Re)MQ-TFIIC1; 2 µl ssDNA Zellulose-Pol III; Bahn 1 dient als TFIID-freie Negativkontrolle; Bahn 2: 3 µl ESF-TFIID (Positivkontrolle); Bahnen 3-10: 5 µl der Superdex 200 Fraktionen 10-17 aus Abb. 3a; Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUmU6.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass Brf2 alleine für die Transkriptionsaktivität von TFIIIU verantwortlich ist. Für die anti Bdp1 reaktiven Proteine der TFIIIU Fraktion konnte keine essentielle Funktion am U6 Gen gezeigt werden. Ob diese Proteine die rekonstituierten Pol III Transkriptionssysteme *in vitro* zumindest verstärken können, sollten die beiden folgenden Transkriptionen klären.

In dem in Abb.5 gezeigten Experiment wurde die Bdp1-haltige Superdex 200 Fraktion 10 der Gelfiltration aus den ESF Fraktionen 7-9 (Abb. 3b), die alle Formen von anti Bdp1 reaktiven Proteinen der TFIIIU Fraktion (zwischen 90 und 148 kDa) enthielt, auf ihre funktionelle Wirkung in der VAI (Abb. 5a) bzw. U6 (Abb. 5b) Transkription untersucht. Bahn 1 der Abb. 5a zeigt das vollständig rekonstituierte, funktionell aktive VAI Transkriptionssystem, wobei eine Bdp1-freie MQ-TFIIIB $\beta$  Fraktion eingesetzt wurde. An diesem System wurden steigende Mengen der "Superdex 200-Bdp1" Fraktion getestet (Bahnen 2-5). Nach quantitativer Auswertung konnte kein transkriptionsverstärkender Effekt dieser Bdp1 Fraktion nachgewiesen werden. Die Transkriptionsaktivität der Bahnen 2-5 erreichte nur 60-90% der Signalstärke in Bahn 1. In der U6 Transkription konnte eine ähnliche Beobachtung gemacht werden (Abb. 5b). Auch hier wurden steigende Mengen der "Superdex 200-Bdp1" Fraktion (Bahnen 2-5) am vollständig rekonstituierten Transkriptionssystem (Bahn 1), welches statt einer ESF-TFIIIU Fraktion eine Superdex 200-Brf2 Fraktion (Abb. 3a; Fraktion 15) enthielt, getestet. In den Bahnen 2-4 wurden 60-80% der Aktivität in Bahn 1 erreicht. Lediglich die größte eingesetzte Menge an dieser "Bdp1 Fraktion" (Bahn 5) war in der Lage, das Aktivitätssignal der Bahn 1 um 11% zu verstärken. Die Zugabe noch größerer Mengen der beschriebenen "Superdex 200-Bdp1" Fraktion zeigte keine funktionelle Veränderung der in Abb. 5 beschriebenen Daten, weder in der U6 noch in der VAI Transkription *in vitro* (Daten nicht gezeigt).

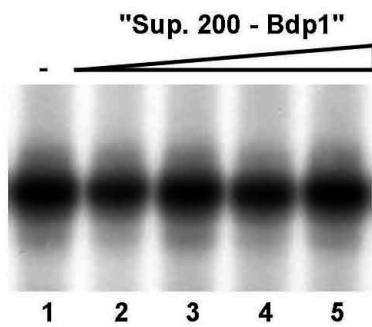


Abb. 5a: VAI *in vitro* Transkription

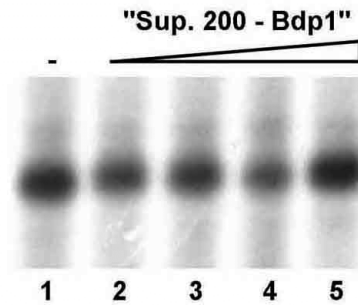


Abb. 5b: U6 *in vitro* Transkription

**Abb. 5: *In vitro* Transkription: Untersuchung der Superdex 200 Fraktion 10 aus Abb. 3b auf ihre funktionelle Wirkung im rekonstituierten Pol III Transkriptionssystem**

**5a:** Bahnen 1-5: 5 µl MQ-TFIIC2; 2,5 µl MQ-TFIIBβ; 10 µl MQ-TFIIC1; 1 µl ssDNA Zellulose-Pol III; Bahnen 2-5: 5 / 10 / 15 / 20 µl "Superdex 200- Bdp1" (Fraktion 10 aus Abb. 3b); Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUVAI.

**5b:** Bahnen 1-5: 2 µl rTBP; 2,5 µl (Re)MQ-PBP; 10 µl (Re)MQ-TFIIC1; 5 µl Superdex 200-Brf2 (Fraktion 15 aus Abb. 3a); 1 µl ssDNA Zellulose-Pol III; Bahnen 2-5: 5 / 10 / 15 / 20 µl "Superdex 200-Bdp1" (Fraktion 10, Abb. 3b); Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUmU6.

Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl VAI wie auch U6 rekonstituierte *in vitro* Transkriptionssysteme vollfunktionell aktiv waren, obwohl diese keinerlei anti-Bdp1 reaktive Proteine im Bereich von 90-200 kDa enthielten. Die Zugabe einer Fraktion, die eine ganze Reihe von potentiellen Bdp1 Molekülen unterschiedlicher Größe enthielt, zeigte keinerlei stimulativen Effekt auf die Pol III Transkription. Diese Daten schienen somit den von Schramm und Teichmann vorgelegten Daten, dass Bdp1 ein essentieller Pol III Transkriptionsfaktor ist, zu widersprechen. Um diese Widersprüche aufzuklären, erschien es dringend erforderlich, die verwendeten Transkriptionssysteme vollständig in Bezug auf die beteiligten Polypeptide aufzuklären. Die Identifizierung des Transkriptionsfaktors TFIIC1 war dabei ein zentraler Baustein.

## **4.2 TFNR ist eine essentielle Komponente der TFIIIC1 Aktivität**

### **4.2.1 Reinigung von TFIIIC1 für eine MALDI TOF Analyse**

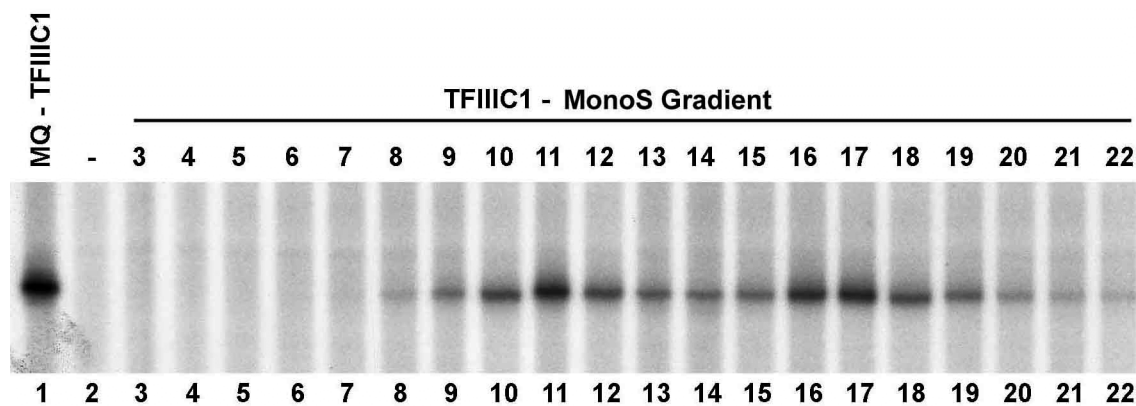
1987 konnte gezeigt werden, dass durch MQ-Chromatographie einer PCC Fraktion die zwei funktionell unterscheidbaren Transkriptionsfaktoren TFIIIC1 und TFIIIC2 chromatographisch trennbar sind (Yoshinaga et al., 1987). Während der sehr gut charakterisierte Multiproteinkomplex TFIIIC2, bestehend aus 5 Untereinheiten, der primär DNA-bindende Transkriptionsfaktor der Typ 2-Gene ist, wird die TFIIIC1 Aktivität für die Transkription aller Pol III abhängigen Gene benötigt (Review: Geiduschek und Kassavetis, 2001). Neben TFIIIC1 konnten zwei weitere Aktivitäten, TFIIIC1like und TFIIIC1', identifiziert werden, welche funktionell mit TFIIIC1 vergleichbar sind (Oettel et al., 1997; Oettel et al., 1998; Wang und Roeder, 1996). Außerdem wird TFIIIC1 und TFIIIC1like eine zentrale Rolle bei der Regulation der Pol III Transkription während der Zelldifferenzierung zugesprochen (Meißner et al., 2002).

Bisher ist es nicht gelungen, die Polypeptid-Zusammensetzung, welche für die TFIIIC1 Aktivität verantwortlich ist, zu identifizieren. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die TFIIIC1 Aktivität chromatographisch gereinigt und von anderen Proteinen abgetrennt, um eine Präparation zu erhalten, die in einer MALDI TOF Analyse hinsichtlich der TFIIIC1-Polypeptid-Zusammensetzung charakterisiert werden konnte (Abb. 7).

H. Hafner (2002) konnte zeigen, dass die MQ-TFIIIC1 Aktivität durch MonoS-Chromatographie in zwei funktionell vergleichbare Aktivitäts-Peaks getrennt werden kann, welche mit 340 mM und 400 mM KCl eluierten. Der Versuch, die Aktivitäten über MonoS Re-Chromatographie in die entsprechend andere Aktivität zu überführen, war nicht möglich. Der größte Anteil an Proteinen eluierte bei einer niedrigeren Salzkonzentration als die beiden TFIIIC1 Aktivitäten von der MonoS. Daher wiesen das 340 mM KCl-Eluat und insbesondere das 400 mM KCl-Eluat eine hohe spezifische Aktivität auf.

Aufgrund ihres sehr guten Reinigungseffekts sollte die MonoS Chromatographie (3.7.3.4) die Basis einer präparativen TFIIIC1 Reinigungsstrategie bilden. Dafür wurden TFIIIC1-aktive MQ Fraktionen mit Transkriptionspuffer auf 200 mM KCl verdünnt und auf eine MonoS Säule geladen. Die Elution erfolgte mit einem

linearen Gradienten von 200-600 mM KCl. Mit der funktionellen Analyse des TFIIIC1-MonoS Gradienten in der VAI Transkription (Abb. 6) konnte die Trennung der ursprünglichen MQ-TFIIIC1 Aktivität in zwei Aktivitäts-Peaks reproduziert werden. Während ein Teil der TFIIIC1 Aktivität in Fraktion 11 (340 mM KCl) eluierte, war die zweite Elution in den Fraktionen 16 und 17 (400 mM KCl) nachweisbar.



**Abb. 6: VAI *in vitro* Transkription: Trennung der MQ-TFIIIC1 Aktivität in TFIIIC1<sub>low</sub> und TFIIIC1<sub>high</sub> durch MonoS Chromatographie**

Bahnen 1-22: 5 µl MQ-TFIIIC2; 2,5 µl MQ-TFIIIBβ; 1 µl ssDNA Zellulose-Pol III; Bahn 1: 10 µl MQ-TFIIIC1 (Positivkontrolle); Bahn 2 dient als TFIIIC1-freie Negativkontrolle; Bahnen 3-22: 5 µl der MonoS Fraktionen 3-22; Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUVAI.

Eine weitere Kationenaustausch-Chromatographie mit jedem der beiden TFIIIC1-MonoS Eluate über eine MiniS Säule (3.7.3.5) konnte die Auftrennung der TFIIIC1 Aktivität in zwei chromatographisch unterscheidbare Formen bestätigen. Dabei eluierte die 340 mM KCl-MonoS Aktivität bei 430 mM KCl und die 400 mM KCl-MonoS Aktivität bei 510 mM KCl von der MiniS (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Beobachtung wurde entschieden, die jeweils früher eluierende TFIIIC1 Form als TFIIIC1<sub>low</sub> (low ionic strength), und die jeweils später eluierende TFIIIC1 Form als TFIIIC1<sub>high</sub> (high ionic strength) zu bezeichnen.

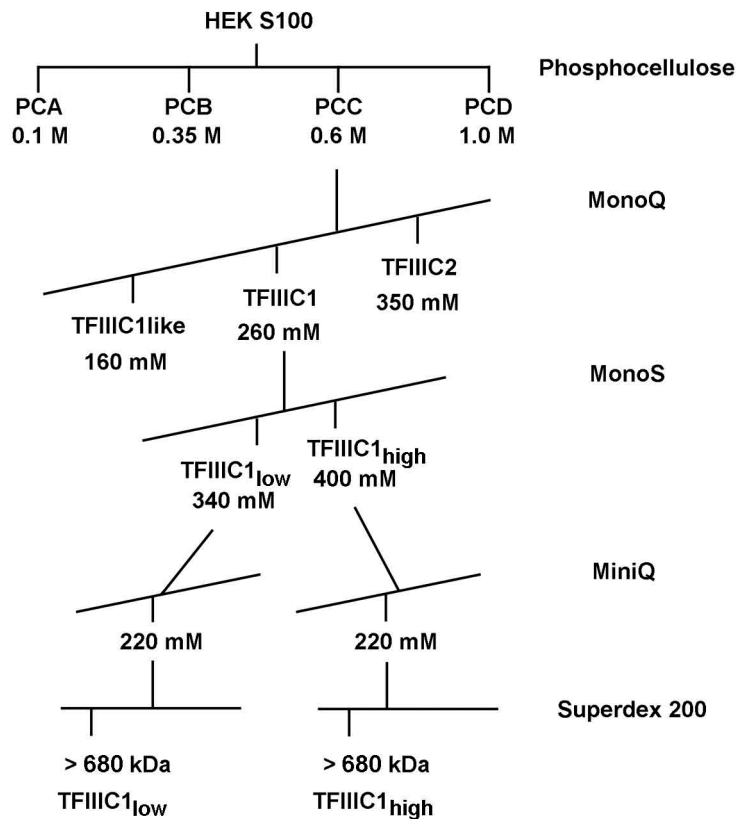


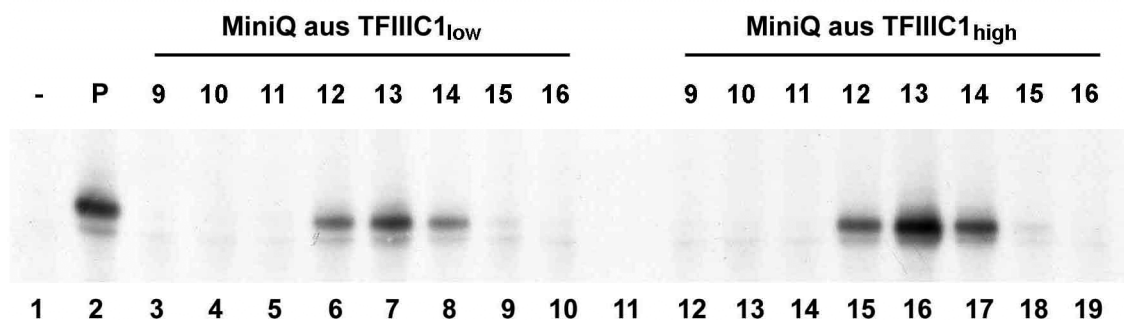
Abb. 7: Reinigungsschema der TFIIIC1 Aktivitäten für eine MALDI TOF Analyse

#### 4.2.1.1 Reinigung von TFIIIC1<sub>low</sub> und TFIIIC1<sub>high</sub> über MiniQ Chromatographie

Für die weitere chromatographische Reinigung von TFIIIC1<sub>low</sub> und TFIIIC1<sub>high</sub> wurde ein neues Material, der Anionenaustauscher MiniQ, verwendet (3.7.3.6). Die TFIIIC1<sub>low</sub> bzw. TFIIIC1<sub>high</sub>-haltigen MonoS Fraktionen (aus zwei identischen MonoS Gradienten) wurden jeweils auf 100 mM KCl verdünnt und gesondert auf eine 0,7 ml MiniQ Säule geladen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Salzgradienten von 100-300 mM KCl. Anschließend wurden die Eluate beider MiniQ Chromatographien in der VAI Transkription auf TFIIIC1 Aktivität getestet (Abb. 8). Interessanterweise zeigten beide TFIIIC1 Aktivitäten das gleiche chromatographische Verhalten auf der MiniQ Säule. Sowohl die TFIIIC1<sub>low</sub> wie auch die TFIIIC1<sub>high</sub> Aktivität eluierten mit 220 mM KCl von der MiniQ (jeweils Fraktionen 12-14), wobei beide TFIIIC1 Aktivitäten ihr

funktionelles Maximum in Fraktion 13 erreichten (Vergleich Bahn 7 mit Bahn 16).

Somit konnte die Auftrennung der TFIIIC1 Aktivität in die “low” und “high” Form per Kationenaustausch-Chromatographie (MonoS, MiniS), nicht aber per Anionenaustausch-Chromatographie (MonoQ, MiniQ) beobachtet werden konnte.



**Abb. 8: VAI *in vitro* Transkription: Untersuchung des Elutionspunktes von TFIIIC1<sub>low</sub> und TFIIIC1<sub>high</sub> während der MiniQ Chromatographie**

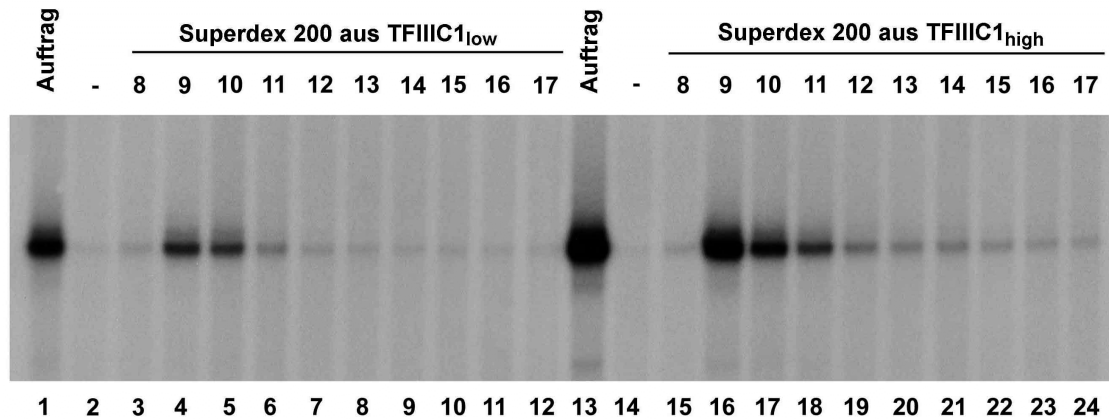
Bahnen 1-19 (Bahn 11 ist leer): 5 µl MQ-TFIIIC2; 2,5 µl MQ-TFIIIB $\beta$ ; 1 µl ssDNA Zellulose-Pol III; Bahn 1 dient als TFIIIC1-freie Negativkontrolle; Bahn 2: 10 µl MQ-TFIIIC1 (Positivkontrolle); Bahnen 3-10: 10 µl der TFIIIC1<sub>low</sub> –MiniQ Fraktionen 9-16; Bahnen 12-19: 10 µl der TFIIIC1<sub>high</sub> –MiniQ Fraktionen 9-16; Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUVAI.

Mit der MiniQ Chromatographie war es gelungen, eine vierte Säule in die TFIIIC1-Reinigungsstrategie einzubringen, während die funktionelle Aktivität beider TFIIIC1 Formen *in vitro* erhalten blieb. Eine vergleichende Analyse von TFIIIC1 Aktivität-enthaltenden mit TFIIIC1 Aktivität-freien MiniQ Fraktionen in einem silbergefärbten SDS-Gel ergab, dass nach der MiniQ Chromatographie ein signifikanter Reinigungseffekt erzielt wurde (50% der Proteine wurden abgetrennt). Dennoch waren für eine MALDI TOF Analyse zu viele Proteine in den TFIIIC1 Fraktionen enthalten (Daten nicht gezeigt).

#### **4.2.1.2 Reinigung von MiniQ- TFIIIC1<sub>low</sub> und -TFIIIC1<sub>high</sub> über Superdex 200**

Da untersucht werden sollte, ob die beiden TFIIIC1 Formen "low" und "high" sich hinsichtlich ihrer molekularen Größe voneinander unterscheiden, wurde mit jeder der beiden TFIIIC1 Aktivitäten eine analytische Gelfiltration mit einer Superdex 200 HR 10/30-Säule durchgeführt (3.7.2.3). Zudem sollte die Gelfiltration einen zusätzlichen Reinigungseffekt erbringen. In anfänglichen Experimenten enthielt der Laufpuffer für die Gelfiltration 60 mM KCl. Unter diesen Bedingungen zeigte die TFIIIC1 Aktivität ein sehr undefiniertes Elutionsverhalten und ihre Aktivität war sehr schwach über den gesamten Bereich der Superdex 200 nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung ließ auf eine Interaktion der Proteine mit dem Säulenmaterial schließen. Um diesen Effekt zu verhindern, wurde der Laufpuffer auf 200 mM KCl eingestellt. Als Auftragsfraktion dienten jeweils 200 µl der MiniQ Fraktion 13 (Abb. 8). Die funktionelle Analyse der gesammelten 1 ml Fraktionen in einem TFIIIC1-freien VAI Transkriptionssystem zeigt die Abb. 9. Die Erhöhung der Salzkonzentration auf 200 mM KCl resultierte in einem scharfen Trennverhalten der Säule. Mit den TFIIIC1 Aktivität-enthaltenden Fraktionen 9-11 (TFIIIC1<sub>low</sub>: Bahnen 4-6; TFIIIC1<sub>high</sub>: Bahnen 16-18) zeigten beide TFIIIC1 Formen interessanterweise das gleiche Superdex 200-Elutionsprofil. Indem beide TFIIIC1 Aktivitäten ab Fraktion 9 (Vergleich Bahnen 4 und 16) in der Superdex 200 Chromatographie funktionell nachweisbar sind, eluierten die beiden TFIIIC1 Formen eine Fraktion nach dem Ausschlussvolumen der Superdex 200 Säule (Fraktion 8). Vergleichschromatographien mit Eichproteinen ergaben, dass sowohl TFIIIC1<sub>low</sub> als auch TFIIIC1<sub>high</sub> ein Molekulargewicht von mehr als 680 kDa aufweisen. Diese Größe ließ auf einen TFIIIC1-Komplex schließen, der wesentlich größer ist, als bisher in der Literatur beschrieben war (ca. 200 kDa, Yoshinaga et al., 1987).





**Abb. 9: VAI *in vitro* Transkription: Test der TFIIIC1<sub>low / high</sub>-Superdex 200 Fraktionen auf funktionelle Aktivität**

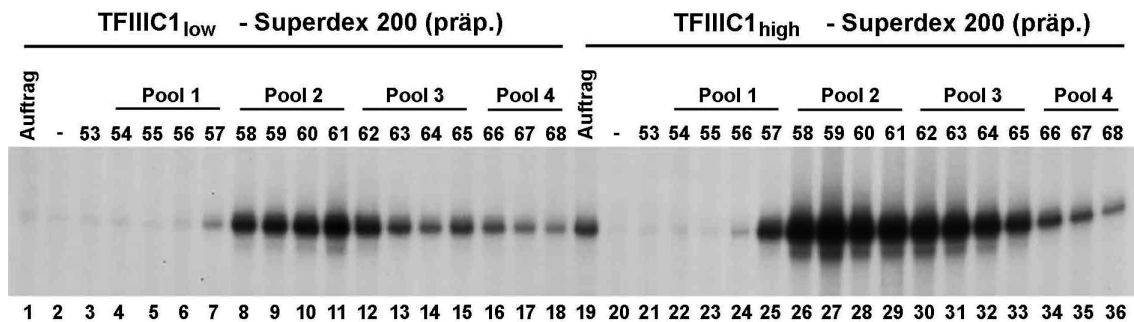
Bahnen 1-24: 5 µl MQ-TFIIIC2; 2,5 µl MQ-TFIIIB $\beta$ ; 1 µl ssDNA Zellulose-Pol III; Bahnen 1 und 13: 10 µl MiniQ-TFIIIC1<sub>low / high</sub> (Fraktionen 13, Abb. 7); Bahnen 2 und 14 dienen als TFIIIC1-freie Negativkontrollen; Bahnen 3-12: 40 µl der TFIIIC1<sub>low</sub>-Superdex 200 Fraktionen 8-17; Bahnen 15-24: 40 µl der TFIIIC1<sub>high</sub>-Superdex 200 Fraktionen 8-17; Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUVAI.

Nun sollte die Superdex 200 Chromatographie auf ihren TFIIIC1 Reinigungseffekt untersucht werden. Dazu wurden 960 µl der TFIIIC1 Superdex 200 Fraktionen mit Strataclean<sup>TM</sup> Resin (3.6.11) konzentriert und auf ein SDS Gel geladen. Die Analyse des silbergefärbten Gels ergab, dass die Proteinkonzentration in den TFIIIC1-aktiven Fraktionen so gering war, dass die Identifizierung einzelner Polypeptide möglich war (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich enthielten die TFIIIC1<sub>high</sub> Fraktionen weniger Protein als die TFIIIC1<sub>low</sub> Fraktionen. TFIIIC1 konnte nun präparativ für eine MALDI TOF Analyse vorbereitet werden.

#### 4.2.1.3 Die präparative Superdex 200 Chromatographie führt zur MALDI TOF Analyse potenzieller TFIIIC1 Untereinheiten

Um die für eine MALDI TOF Analyse benötigte Proteinmenge zu erhalten, wurde nun eine präparative Superdex 200 Chromatographie (XK 16/70) durchgeführt (3.7.2.3). Diese ermöglichte das Auftragen von 2 ml einer MiniQ-TFIIIC1<sub>low</sub> bzw. -TFIIIC1<sub>high</sub> Präparation. Um eine möglichst hohe Auflösung bei der präparativen Chromatographie zu erreichen, wurden die Eluate in 1 ml

Fraktionen gesammelt, welche für eine Säule diesen Volumens relativ klein sind. Diese Fraktionen wurden zunächst in der VAI *in vitro* Transkription auf ihre funktionelle Aktivität getestet (Abb. 10). Die Fraktionen der TFIIIC1<sub>high</sub> Präparation (Bahnen 21-36) führten zu einer höheren Transkriptionseffizienz als die Fraktionen der TFIIIC1<sub>low</sub> Präparation (Bahnen 3-18). Dennoch zeigten beide Aktivitäten ein vergleichbares Elutionsprofil. Die Fraktionen 58-61 (Pool 2) beider Aktivitäten stellten die stärksten Transkriptionssignale dar. Im Falle der "high" Präparation transkribierten auch die Fraktionen 62-65 (Pool 3) effizient.



**Abb. 10: VAI *in vitro* Transkription: Test der präparativen Superdex 200 auf TFIIIC1<sub>low</sub> / high Aktivität**

Bahnen 1-36: 5 µl MQ-TFIIIC2; 2,5 µl MQ-TFIIIBβ; 1 µl ssDNA Zellulose-Pol III; Bahnen 1 und 19: 10 µl MiniQ-TFIIIC1<sub>low</sub> / high; Bahnen 2 und 20 dienen als TFIIIC1-freie Negativkontrollen; Bahnen 3-18: 40 µl der TFIIIC1<sub>low</sub> -Superdex 200 (präparativ) Fraktionen 53-68; Bahnen 21-36: 40 µl der TFIIIC1<sub>high</sub> -Superdex 200 (präparativ) Fraktionen 53-68; Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUVAI.

Die in Abb. 10 gezeigten Superdex 200 Fraktionen sollten nun für die Identifizierung potenzieller Polypeptide, welche für die TFIIIC1 Aktivität verantwortlich sind, verwendet werden. Dafür wurden jeweils die Fraktionen 54-57 (Pool 1) als nahezu TFIIIC1-freie Proben, die Fraktionen 58-61 (Pool 2) bzw. 62-65 (Pool 3) als TFIIIC1-haltige Proben und die Fraktionen 66-69 (Pool 4) als weitere Kontrolle zusammengefasst. Jeweils 3,5 ml der so entstandenen Pools wurden mit Strataclean<sup>TM</sup> Resin (3.6.11) konzentriert, auf ein SDS Gel geladen und elektrophoretisch getrennt. Die anschließende Färbung des Gels erfolgte im Hinblick auf eine mögliche MALDI TOF Analyse mit der nicht-fixierenden



Die MALDI TOF Analyse dieser neun Polypeptide wurde im Zentrum für Molekulare Biologie (ZMBH), Zentrale Einheit Biomolekulare Chemie in Heidelberg durchgeführt. Das Ausstechen der Polypeptide erfolgte aus Bahn 8 des Gels (Abb. 11), wobei sieben der neun identifizierten Polypeptide analysiert werden konnten. Die Ergebnisse der MALDI TOF Analyse sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Probe	Protein	MW (kDa)	IP	Score	Abdeckung
Bande 1	TRRAP (transformation/transcription domain-associated protein [Homo sapiens])	438	8,52	142	8
Bande 2	TFNR (Transcription Factor-like Nuclear Regulator [Homo sapiens])	247	5,10	110	10
Bande 3	CDC42-binding protein kinase beta [Homo sapiens]	188	5,97	102	10
Bande 4					
Bande 5	Protein KIAA0052	119	6,19	107	18
Bande 6	GCN5 general control of amino-acid synthesis 5-like 2	95	9,15	117	14
Bande 7	PCAF associated factor 65 beta	67	5,55	120	21
Bande 8	hypothetical protein DKFZp434F2427.1-human	55	6,79	74	19
Bande 9					

**Tab. 1: MALDI TOF Analyse der Superdex 200-TFIIC1<sub>high</sub> Aktivität**

IP: Isoelektrischer Punkt, Score: Wahrscheinlichkeit des identifizierten Polypeptids, Abdeckung: Abdeckung der Aminosäuren des isolierten Polypeptids

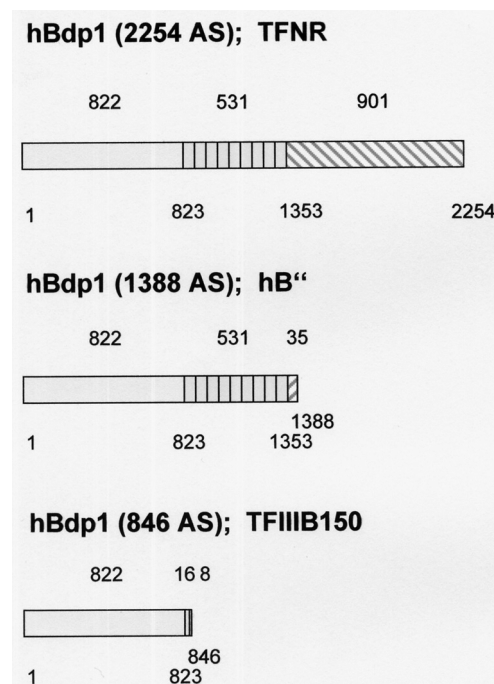
Die Auswertung der MALDI TOF Ergebnisse machte deutlich, dass die TFIIC1<sub>high</sub> Präparation Proteine enthielt, die Bestandteil von Histon Acetyltransferase (HAT) -Komplexen sind (TRRAP, GCN5 und PCAF associated factor 65 beta; Banden 1, 6 und 7 der Tab. 1). Diese "Mediator"-Komplexe spielen für die Pol II Transkriptionsregulation eine wichtige Rolle. Da für TFIIC1 eine transkriptionsregulatorische Funktion beschrieben worden ist (Meißner et al., 2002), schien es möglich, dass die TFIIC1 Aktivität durch diese oder eines dieser Proteine repräsentiert wird.

Das aus Bande 2 analysierte 247 kDa Protein TFNR ("Transcription Factor-like Nuclear Regulator") wurde 2000 von Kelter et al. identifiziert. Die Autoren stellten strukturelle Homologie zu Hefe Bdp1 fest. Da sich diese Homologie ausschließlich auf einen kleinen Bereich innerhalb des N-Terminus von TFNR

beschränkte, hielten sie es für unwahrscheinlich, dass es sich bei TFNR um das humane Homolog von Hefe Bdp1 handelt.

Ebenfalls 2000 wurde ein 150-160 kDa Protein als humanes Homolog zu yBdp1 berichtet, welches funktionell als genereller Pol III Transkriptionsfaktor charakterisiert wurde (Schramm et al., 2000; M. Teichmann, persönliche Mitteilung). Dieses 150-160 kDa Protein und TFNR (250 kDa) werden seit 2002 in einer neuen Nomenklatur als hBdp1 bezeichnet (Willis et al., 2002), obwohl für TFNR bisher keinerlei Funktion gezeigt werden konnte.

Mit der Auswertung der MALDI TOF Ergebnisse wurde ein Sequenzvergleich der unterschiedlich großen hBdp1 Proteine durchgeführt, welcher ergab, dass TFNR die Volle-Länge Variante von hBdp1 darstellt und N-terminal mit den beiden kleineren hBdp1-Varianten identisch ist (Abb. 12).



**Abb. 12: Graphische Darstellung der charakterisierten hBdp1-Formen**

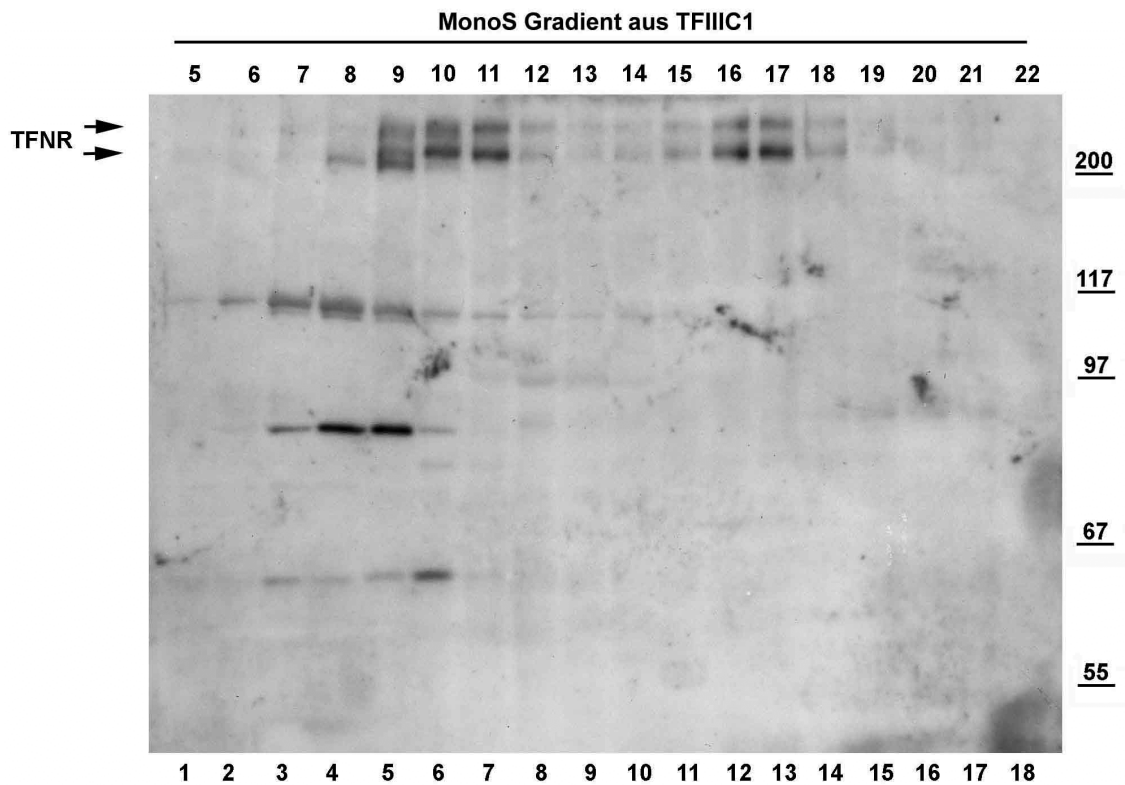
Die Aminosäuresequenz des N-Terminus (AS 1-822) ist für alle drei hBdp1-Varianten identisch (TFIIIB150, hB'' und TFNR). Die Wiederholungsmotive (AS 823-1352) weisen nur die hBdp1-Varianten hB'' (1388 AS, Schramm et al., 2000) und TFNR (2254 AS, Kelter et al., 2000) auf. TFIIIB150 (846 AS, M. Teichmann) enthält lediglich 16 Aminosäuren des ersten Wiederholungsmotivs. Der 901 Aminosäuren umfassende C-Terminus (AS 1353-2254) ist für die 250 kDa-Variante TFNR spezifisch.

Im Folgenden sollten nun TFIIIC1<sub>low</sub>- und TFIIIC1<sub>high</sub>-Fraktionen auf ihren Gehalt an TFNR, GCN5 und TRRAP in Western Blot Analysen untersucht werden. Spezifische Antikörper gegen GCN5/PCAF und TRRAP konnten bei der Firma Santa Cruz erworben werden und TFNR sollte aufgrund seines mit hBdp1 identischen N-Terminus mit unseren Bdp1-Antikörpern, welche ein Epitop im Bdp1 N-Terminus erkennen, nachweisbar sein.

#### **4.2.2 TFNR koeluiert mit den Aktivitäten TFIIIC1<sub>low</sub> und TFIIIC1<sub>high</sub> über MonoS und MiniQ**

Die Fraktionen des TFIIIC1-MonoS Gradienten, die mit der Abb. 6 in der VAI *in vitro* Transkription getestet worden sind, wurden im Western Blot mit Bdp1 Antikörpern auf TFNR untersucht (Abb. 13). Dabei konnte eine Doppelbande im Bereich von 220 und 250 kDa detektiert werden, wobei es sich bei der 250 kDa Bande um die Volle-Länge Form von TFNR (2254 Aminosäuren) handelt und die 220 kDa Bande wahrscheinlich die 2187 Aminosäure-Spleißvariante von TFNR darstellt (GenBank Nr.: AJ279120.1-AJ279150.1). Auffällig war die gute Koelution beider Komponenten dieser Doppelbande mit den beiden TFIIIC1 Transkriptionsaktivitäten. Ein Vergleich mit der Abb. 6 ergab, dass das Transkriptionsmaximum der TFIIIC1<sub>high</sub>-haltigen Fraktionen 16 und 17 mit dem maximalen Gehalt an dieser 220/250 kDa Doppelbande korreliert. Im Bereich der TFIIIC1<sub>low</sub> Aktivität zeigten die Fraktionen 9-11 das stärkste Signal bei 220/250 kDa (Abb. 13), wobei das Aktivitätsmaximum ausschließlich in Fraktion 11 (Abb. 6) nachweisbar war. Kleinere Proteine (<200 kDa), welche auch von den Bdp1 Antikörpern erkannt wurden, zeigten keine Koelution mit den beiden TFIIIC1 Aktivitäten.

Für den Nachweis der 220/250 kDa Doppelbande in den TFIIIC1-MonoS Fraktionen war es nötig, 200-250 µl der Proben für die SDS PAGE einzusetzen. Die TFNR-Konzentration ist so gering, dass mit den 80 µl einer MQ-TFIIIC1 Fraktion, die im Western Blot der Abb. 1 eingesetzt worden sind, TFNR nicht detektiert werden konnte, obwohl die anderen Transkriptionsfaktoren mit eingesetzten 80 µl sehr gut nachweisbar sind.



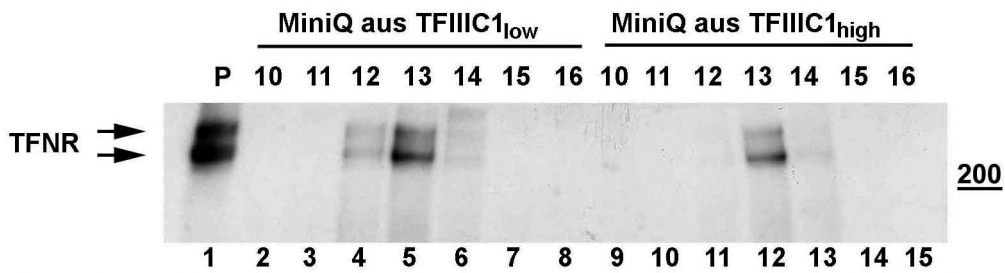
**Abb. 13: Western Blot: Untersuchung des TFIIIC1-MonoS Gradienten auf TFNR**

Bahnen 1-18: 250 µl der TFIIIC1-MonoS Fraktionen 5-22

8% SDS Trenngel; Membraninkubation mit anti Bdp1 Antikörper (1:400); Zweitantikörper: <sup>125</sup>I-markierter anti rabbit Antikörper (1µCi/ml)

Im folgenden Schritt wurden die TFIIIC1<sub>low</sub> und TFIIIC1<sub>high</sub> Fraktionen der MiniQ Gradienten aus Abb. 8 im Western Blot mit Bdp1 Antikörpern untersucht. Die Abb. 14 zeigt eine strenge Koelution beider TFIIIC1 Aktivitäten (jeweils Fraktionen 12-14) mit der TFNR-Doppelbande (Vergleich Abb. 8 und 14 ). Zusätzlich konnte in den Fraktionen 13, welche das funktionelle Maximum der jeweiligen TFIIIC1 Aktivität aufwiesen, auch die größte Menge an beiden Komponenten der TFNR-Doppelbande nachgewiesen werden.

Die exakte Koelution von TFNR mit beiden TFIIIC1 Aktivitäten über MiniQ wies sehr deutlich darauf hin, dass TFNR an der transkriptionsaktivierenden Funktion von TFIIIC1 beteiligt ist.

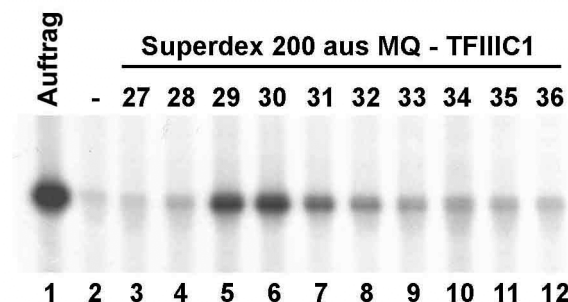


**Abb. 14: Western Blot: Untersuchung der TFIIIC1<sub>low</sub>- und TFIIIC1<sub>high</sub>-MiniQ Gradienten mit anti Bdp1 Antikörpern**

Bahn 1: 250 µl MQ-TFIIIC1; Bahnen 2-8: 200 µl der TFIIIC1<sub>low</sub>-MiniQ Fraktionen 10-16; Bahnen 9-15: 200 µl der TFIIIC1<sub>high</sub>-MiniQ Fraktionen 10-16

8% SDS Trenngel; Membraninkubation mit anti Bdp1 Antikörper (1:400); Zweitantikörper: <sup>125</sup>I-markierter anti rabbit Antikörper (1 µCi/ml)

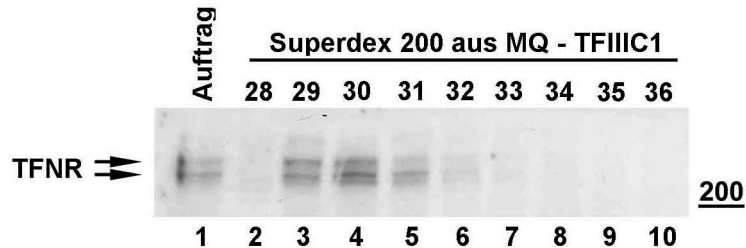
Um auch auf Ebene der Superdex 200 Chromatographie die Koelution von TFNR mit der TFIIIC1 Aktivität bestätigen zu können, wurde eine weitere präparative Gelfiltration (XK 16/70) durchgeführt. Dazu wurden 2 ml einer MQ-TFIIIC1 Fraktion auf die Säule geladen, wobei die Eluate in diesem Fall in 2 ml Fraktionen gesammelt wurden. Die funktionelle Analyse der Superdex 200 Fraktionen in der VAI Transkription (Abb. 15a) und deren Untersuchung mit Bdp1 Antikörpern im Western Blot (Abb. 15b) zeigte wiederholt eine exakte Koelution der TFIIIC1-aktiven Proben (Abb. 15a, Fraktionen 29-31) mit der 220/250 kDa TFNR-Doppelbande (Abb. 15b, Fraktionen 29-31).



**Abb. 15a: VAI *in vitro* Transkription: Test einer präparativen TFIIIC1-Superdex 200 Chromatographie auf VAI Transkriptionsaktivität**



Bahnen 1-12: 5 µl MQ-TFIIC2; 2,5 µl MQ-TFIIBβ; 1 µl ssDNA Zellulose-Pol III; Bahn 1: 10 µl MQ-TFIIC1; Bahn 2 dient als TFIIC1-freie Negativkontrolle; Bahnen 3-12: 40 µl der TFIIC1-Superdex 200 Fraktionen 27-36; Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUVAI.



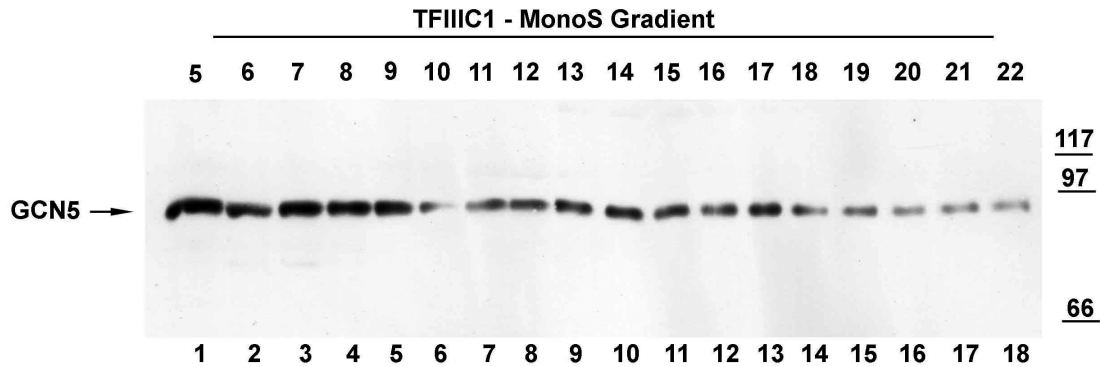
**Abb. 15b: Western Blot: Untersuchung der Superdex 200 Fraktionen (präparativ) mit anti Bdp1 Antikörpern**

Bahn 1: 200 µl MQ-TFIIC1; Bahnen 2-10: 80 µl der TFIIC1-Superdex 200 Fraktionen 28-36 (1,9 ml jeder Fraktion wurden zuvor mit Strataclean<sup>TM</sup> Resin (3.6.11) konzentriert)

8% SDS Trenngel; Membraninkubation mit anti Bdp1 Antikörper (1:400); Zweitantikörper: <sup>125</sup>I-markierter anti rabbit Antikörper (1µCi/ml)

#### **4.2.3 GCN5 ist Bestandteil der MonoS- und MiniQ-TFIIC1<sub>low / high</sub> Fraktionen**

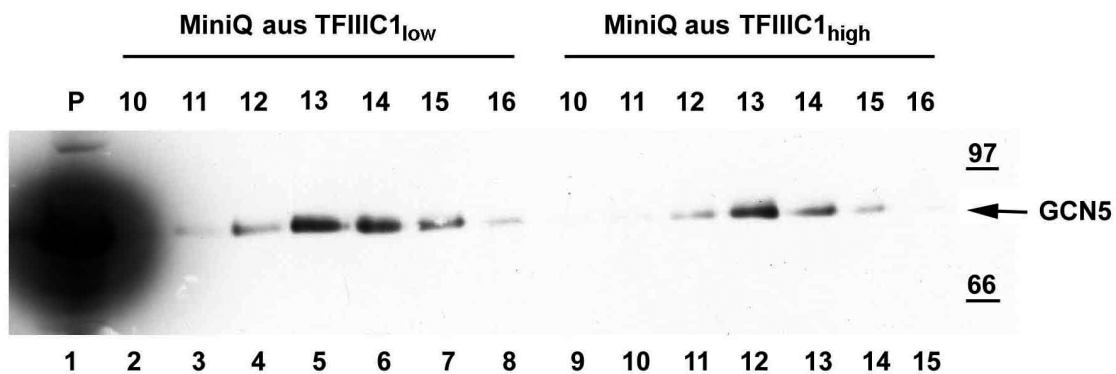
Die nächste Untersuchung der beiden TFIIC1 Aktivitäten galt der Koelution mit GCN5. Dafür wurden die PVDF Membranen der Abbildungen 13 und 14 mit monoklonalen GCN5 Antikörpern inkubiert. Die Detektion des Zweitantikörpers erfolgte per Chemilumineszenz-Reaktion. Die Abb. 16 zeigt die GCN5 Verteilung innerhalb des TFIIC1-MonoS Gradienten (Transkription in Abb. 6). GCN5 war über den gesamten Bereich von Fraktion 5-22 nachweisbar und somit auch in denjenigen Fraktionen, die keine Transkriptionsaktivität aufwiesen. Diese Beobachtung war keinesfalls auf einen missglückten MonoS-Lauf zurückzuführen. GCN5 scheint zu solchen Proteinen zu gehören, die auf bestimmten Säulenmaterialien ein ungünstiges Verhalten zeigen. Im Gegensatz dazu ist auf Ebene der MiniQ Chromatographie (Abb. 17) eine gute Koelution von GCN5 mit der TFIIC1<sub>high</sub> Aktivität (Fraktionen 12-14) zu sehen (Vergleich Abb. 8). Im Falle der MiniQ-TFIIC1<sub>low</sub> Aktivität ist das GCN5 Elutionsprofil im Vergleich zur Transkriptionsaktivität (Fraktionen 12-14, Abb. 8) um eine Fraktion verschoben (GCN5-Maximum in Fraktionen 13-15, Abb. 17).



**Abb. 16: Western Blot: Untersuchung des TFIIIC1-MonoS Gradienten auf GCN5**

Bahnen 1-18: 250 µl der TFIIIC1-MonoS Fraktionen 5-22

8% SDS Trenngel; Membraninkubation mit anti GCN5/PCAF Antikörper (1:400); Zweitantikörper: Peroxidase-markierter anti mouse Antikörper (1:2000)



**Abb. 17: Western Blot: Untersuchung der TFIIIC1<sub>low</sub>-und TFIIIC1<sub>high</sub>-MiniQ Gradienten auf GCN5**

Bahn 1: 250 µl MQ-TFIIIC1; Bahnen 2-8: 200 µl der TFIIIC1<sub>low</sub>-MiniQ Fraktionen 10-16; Bahnen 9-15: 200 µl der TFIIIC1<sub>high</sub>-MiniQ Fraktionen 10-16

8% SDS Trenngel; Membraninkubation mit anti GCN5/PCAF Antikörper (1:400); Zweitantikörper: Peroxidase-markierter anti mouse Antikörper (1:2000)

Ob TFNR alleine das entscheidende Protein ist, welches die TFIIIC1 Aktivität repräsentiert, konnte an dieser Stelle noch nicht eindeutig geklärt werden, da auch GCN5 zumindest mit der MiniQ-TFIIIC1<sub>high</sub> Aktivität koeluierte. Möglicherweise sind TFNR und GCN5 Bestandteil eines Multiproteinkomplexes, der für die TFIIIC1 Aktivität verantwortlich ist. Zudem könnte auch das größte der

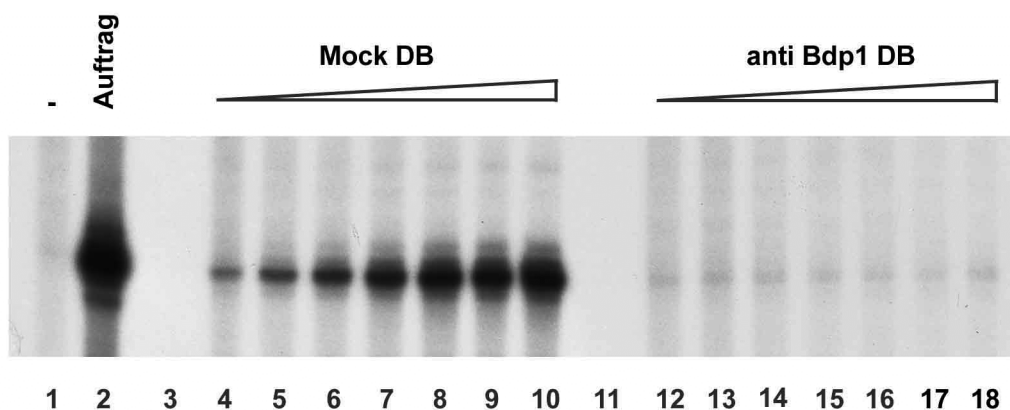
MALDI TOF-analysierten Proteine, TRRAP, eine Komponente des möglichen TFIIIC1-Komplexes sein. Diese Überlegungen könnten eine Erklärung für das Ergebnis der Größenbestimmung von TFIIIC1 (> 680 kDa) liefern. Leider gelang der Transfer des 438 kDa Proteins TRRAP aus dem SDS Gel auf die PVDF Membran nur ein einziges Mal. Dabei wurden Fraktionen eines typischen MQ Gradienten im Bereich der TFIIIC1 Elution auf ihren Gehalt an TRRAP untersucht (4.3; Abb. 22c). In diesem Western Blot konnte unter anderem gezeigt werden, dass sowohl TFIIIC1-aktive MQ-Fraktionen wie auch TFIIIC1-inaktive MQ-Fraktionen TRRAP enthielten, was nicht auf eine Koelution von TRRAP mit der TFIIIC1 Aktivität schließen ließ. Zudem konnte eine perfekte Koelution von GCN5 mit TRRAP beobachtet werden (Abb. 22b/c).

#### ***4.2.4 Die TFNR-Depletion von TFIIIC1 Fraktionen führt zum Verlust der TFIIIC1-Transkriptionsaktivität in vitro***

Um TFNR als essentielle Komponente der TFIIIC1 Aktivität bestätigen zu können, sollte eine Immunodepletion/Immunopräzipitation einer TFIIIC1 Fraktion mit Antikörpern gegen Bdp1 durchgeführt werden. Mit diesem Experiment sollte auch geklärt werden, ob oder mit welchen Protein(en) TFNR einen Komplex bildet.

Die Immunodepletion einer TFIIIC1 Fraktion wurde per Affinitäts-Chromatographie mit 1 ml HiTrap ProteinG Säulen durchgeführt (3.6.9). Dafür wurden zunächst 0,7 mg Bdp1 Antikörper bzw. Präserum-Antikörper (Mock-Negativkontrolle) kovalent an die Säulen gekoppelt (3.6.8). Eine anschließende Behandlung der Säulen mit BSA sollte mögliche freie Bindungsstellen blockieren. Nun wurden die Säulen jeweils mit 0,7 ml einer MQ-TFIIIC1 Fraktion, welche nachweislich TFNR, GCN5 und TRRAP enthält (4.3; Abb. 22a-c), beladen. Nach einer 30 minütigen Inkubation wurde der Durchbruch beider Säulen fraktioniert aufgefangen. Die Elution der Präzipitate erfolgte mit 0,1 M Glycin (pH 2.7). Diese sauren Eluate wurden direkt im Anschluss über eine G25-Gelfiltrationssäule (3.6.4) in Transkriptionspuffer mit pH 7.9 überführt, da Vorexperimente ergaben, dass TFIIIC1 nach 15 min bei pH 2.7 und anschließendem Umpuffern in pH 7.9 seine Transkriptionsaktivität verliert (Daten nicht gezeigt). Die Durchbrüche beider Säulen wurden im Hinblick auf

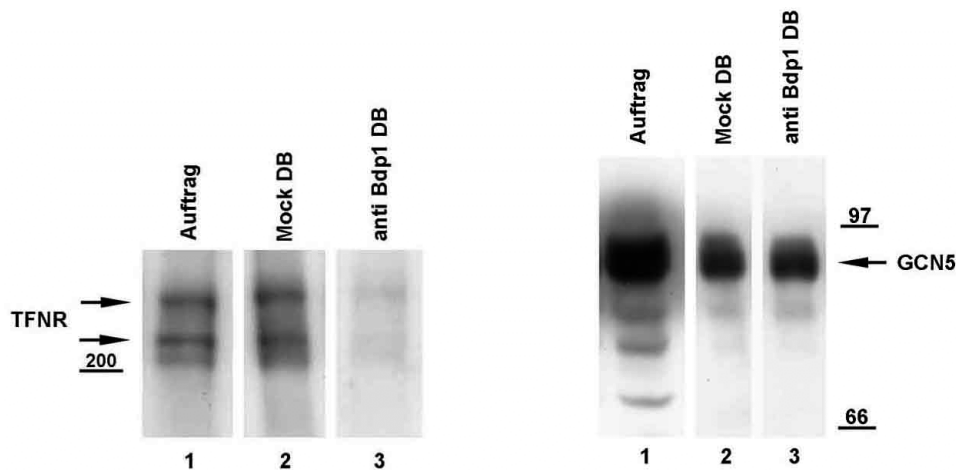
ihre TFIIIC1 Transkriptionsaktivität in der VAI *in vitro* Transkription getestet, welche mit der Abb. 18 dargestellt ist. Der Durchbruch der Mock-Säule (Negativkontrolle) konnte die Transkription des TFIIIC1-defizienten VAI-Systems rekonstituieren, wobei dessen TFIIIC1 Transkriptionsaktivität mit der des Auftrags vergleichbar ist (Vergleich Bahn 2 mit Bahnen 4-10). Dagegen war der Durchbruch der anti Bdp1 Säule inaktiv (Bahnen 12-18). Damit war die vollständige Depletion der TFIIIC1 Aktivität mit Bdp1 Antikörpern gelungen.



**Abb. 18: VAI *in vitro* Transkription: Depletion der TFIIIC1 Aktivität einer MQ-TFIIIC1 Fraktion mit Bdp1 Antikörpern**

Bahnen 1-18 (Bahnen 3 und 12 sind leer): 5  $\mu$ l MQ-TFIIIC2; 2,5  $\mu$ l MQ-TFIIIB $\beta$ ; 1  $\mu$ l ssDNA Zellulose-Pol III; Bahn 1 dient als TFIIIC1-freie Negativkontrolle; Bahn 2: 20  $\mu$ l MQ-TFIIIC1; Bahnen 4-10: 1 / 2,5 / 5 / 7,5 / 10 / 15 / 20  $\mu$ l des Mock-Durchbruchs; Bahnen 12-18: 1 / 2,5 / 5 / 7,5 / 10 / 15 / 20  $\mu$ l des anti Bdp1-Durchbruchs; Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUVAI.

Die Durchbrüche wurden nun im Western Blot auf ihren Gehalt an TFNR überprüft (Abb. 19a). Sowohl im Auftrag (Bahn 1), als auch im Mock-Durchbruch (Bahn 2) konnte die 220/250 kDa TFNR-Doppelbande sehr gut nachgewiesen werden. Dagegen zeigte der funktionell inaktive anti Bdp1-Durchbruch (Bahn 3) ein kaum detektierbares TFNR-Signal. Mit dieser Immunodepletion konnte eindeutig bewiesen werden, dass TFNR eine funktionelle Komponente der TFIIIC1 Aktivität darstellt. Eine entsprechende Untersuchung der Durchbrüche auf GCN5 ergab (Abb. 19b), dass der anti Bdp1-Durchbruch (Bahn 3) vergleichbare Mengen an GCN5 enthielt, wie die Mock-Negativkontrolle (Bahn 2).



**Abb. 19a/b: Western Blot: Untersuchung der Mock -und anti Bdp1 -Durchbrüche auf TFNR (a) und GCN5 (b)**

Bahn 1: 250  $\mu$ l MQ-TFIIIC1; Bahn 2: 450  $\mu$ l des Moch-Durchbruchs; Bahn 3: 450  $\mu$ l des anti Bdp1-Durchbruchs (Bevor die Proben auf das Gel geladen worden sind, wurde eine Konzentrierung auf jeweils 80  $\mu$ l mit Strataclean<sup>TM</sup> Resin (3.6.11) durchgeführt.)

8% SDS Trenngel; **a:** Membraninkubation mit anti Bdp1 Antikörper (1:400); Zweitantikörper: <sup>125</sup>I-markierter anti rabbit Antikörper (1 $\mu$ Ci/ml); **b:** Membraninkubation mit anti GCN5/PCAF Antikörper (1:400); Zweitantikörper: Peroxidase-markierter anti mouse Antikörper (1:2000)

Die Supplementation eines TFIIIC1-freien Systems mit den Eluaten beider HiTrap ProteinG Säulen führte zu keiner VAI Transkription (Daten nicht gezeigt). Vermutlich hat der saure pH-Wert des Elutionspuffers die pH-empfindliche TFIIIC1 Aktivität inaktiviert, trotz direkter Überführung in Transkriptionspuffer mit pH-Wert von 7.9. Auch die Western Blot Analyse der Eluate im Hinblick auf TFNR und GCN5 konnte nicht ausgewertet werden, da die Bahnen einen sehr starken Hintergrund aufwiesen, was auf eine Quervernetzung von zum Teil eluierten Antikörpern zurückzuführen sein könnte (Daten nicht gezeigt).

Eine zweite Immunopräzipitation sollte unter präparativen Gesichtspunkten durchgeführt werden, um gegebenenfalls die Eluate in einer MALDI TOF Analyse hinsichtlich einer TFNR-Koimmunopräzipitation untersuchen zu können. Dafür wurde eine MonoS-TFIIIC1<sub>high</sub> Fraktion verwendet. Die Elution der Präzipitate erfolgte mit dem „non-denaturing Elution Buffer“ der Firma

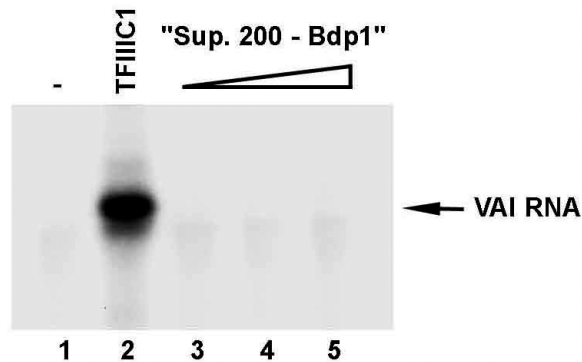
Interchim, welcher pH-neutral ist (3.6.9). Mit der Analyse der Durchbrüche (*in vitro* Transkription und Western Blot) konnten die Ergebnisse der vorherigen Depletion reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Für die Analyse weiterer potentieller TFIIIC1-Polypeptide wurden die gegen 1x PBS dialysierten HiTrap-Eluate dieser präparativen Immunopräzipitation auf ein SDS Gel geladen und anschließend mit Simply Blue<sup>TM</sup> Safe Stain (Invitrogen) gefärbt. Die Auswertung des Gels, hinsichtlich einer TFNR-Koimmunopräzipitation, konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da die Bahnen einen sehr starken Hintergrund aufwiesen und somit die Identifizierung einzelner Polypeptide unmöglich war (Daten nicht gezeigt). Somit konnte keine MALDI TOF Analyse des anti Bdp1-Präzipitats durchgeführt werden.

### **Zusammenfassung:**

Mit der Immunodepletion von TFIIIC1-aktiven Fraktionen mittels anti Bdp1 Antikörpern, welche zum vollständigen Verlust der TFIIIC1 Transkriptionsaktivität führte, konnte endgültig abgesichert werden, dass das bisher funktionell uncharakterisierte Bdp1-Protein TFNR eine integrale Komponente der TFIIIC1 Aktivität darstellt und für deren funktionelle Repräsentation in der Pol III *in vitro* Transkription essentiell ist.

#### **4.2.5 Die anti Bdp1 reaktiven Proteine der TFIIU Fraktion zeigen keine TFIIIC1 Aktivität**

Da das 250 kDa Protein TFNR strukturell die volle Länge Variante von hBdp1 darstellt und funktionell die TFIIIC1 Aktivität repräsentiert, sollte an dieser Stelle überprüft werden, ob die 90-150 kDa anti Bdp1 reaktiven Proteine der TFIIU Fraktion ebenfalls TFIIIC1 Aktivität aufweisen. Dafür wurde die unter 4.1 präparierte "Superdex 200-Bdp1" Fraktion, welche alle anti Bdp1 reaktiven Formen der TFIIU Fraktion enthielt (4.1; Abb. 3b, Bahn 3), im TFIIIC1-freien VAI Transkriptionssystem in steigenden Mengen getestet (Abb. 20). Jedoch führte die Zugabe dieser Fraktion (Bahnen 3-5) im Vergleich zu einer MQ-TFIIIC1 Fraktion (Bahn 2) zu keiner VAI *in vitro* Transkription. Somit konnte für diese anti Bdp1 reaktiven Proteine keine TFIIIC1 Aktivität nachgewiesen werden.

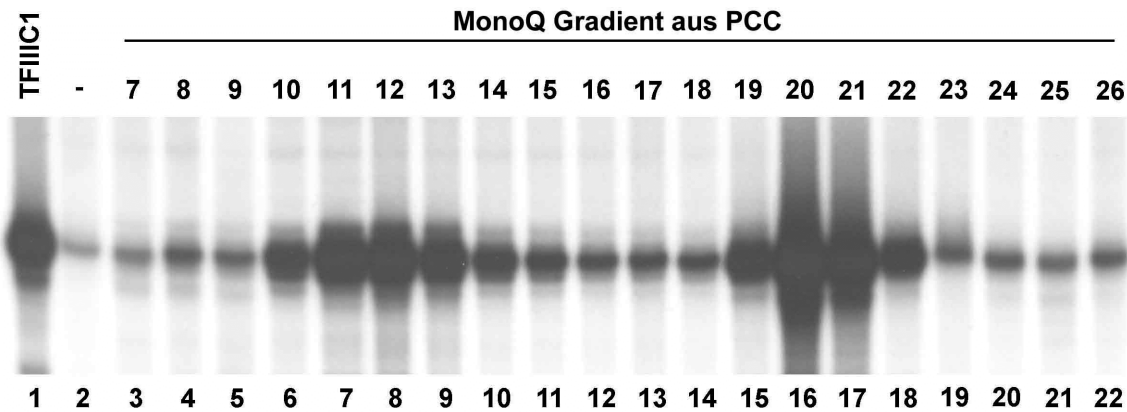


**Abb. 20: *In vitro* Transkription: Test von anti Bdp1 reaktiven Proteinen der TFIIIU Fraktion auf TFIIIC1 Transkriptionsaktivität**

Bahnen 1-5: 5 µl MQ-TFIIIC2; 2,5 µl MQ-TFIIIBβ; 1 µl ssDNA Zellulose-Pol III; Bahn 1 dient als TFIIIC1-freie Negativkontrolle; Bahn 2: 10 µl MQ-TFIIIC1 (Positivkontrolle); Bahnen 3-5: 10 / 20 / 30 µl der "Superdex 200-Bdp1" Fraktion (Fraktion 10 aus Abb. 3b); Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUVAI.

#### **4.3 Die 150-160 kDa Bdp1 Formen repräsentieren die TFIIIC1like Aktivität**

Angesichts der funktionellen Austauschbarkeit von TFIIIC1 und TFIIIC1like in der Pol III *in vitro* Transkription stellte sich die Frage, ob TFNR auch für die Transkriptionsaktivität von TFIIIC1like verantwortlich ist. Da TFIIIC1like mittels MQ-Chromatographie einer PCC Fraktion von TFIIIC1 trennbar ist (3.7.3.1), sollte für die Beantwortung dieser Frage ein typischer MQ Gradient analysiert werden. Die VAI Transkription dieses Gradienten ist in der Abb. 21 zu sehen. TFIIIC1like eluierte mit 160 mM KCl in den Fraktionen 10-14 und TFIIIC1 mit 260 mM KCl in den Fraktionen 19-22.

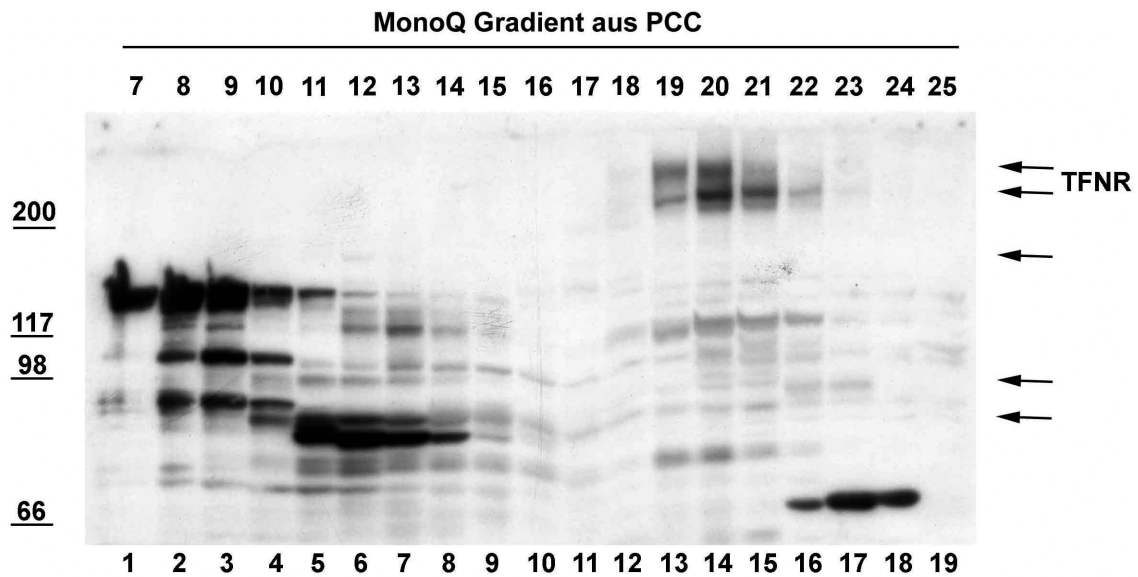


**Abb. 21: VAI *in vitro* Transkription: Test eines MQ Gradienten auf TFIIIC1 Aktivitäten**

Bahnen 1-22: 5 µl MQ-TFIIIC2; 2,5 µl MQ-TFIIIB $\beta$ ; 1 µl ssDNA Zellulose-Pol III; Bahn 1: 10 µl MQ-TFIIIC1 (Positivkontrolle); Bahn 2 dient als TFIIIC1-freie Negativkontrolle; Bahnen 3-22: 10 µl der MQ-Fractionen 7-26; Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUVAI.

Dieser MQ Gradient wurde nun im Western Blot mit anti Bdp1 Antikörpern analysiert (Abb. 22a). Dazu wurden jeweils 250 µl der Fraktionen auf ein SDS Gel geladen. Wie erwartet koeluierte die 220/250 kDa TFNR-Doppelbande mit den TFIIIC1-aktiven Fraktionen 19-22. Im Gegensatz dazu konnte in den TFIIIC1like Fraktionen (10-14) kein Protein im Bereich von 220-250 kDa mit den Bdp1 Antikörpern nachgewiesen werden. Dennoch erkannte der Antikörper verschiedene kleinere Proteine <200 kDa (mit Pfeilen markiert) in den TFIIIC1like Fraktionen, die aber auf Ebene der MQ-Reinigung der TFIIIC1like Aktivität nicht exakt zugeordnet werden konnten.



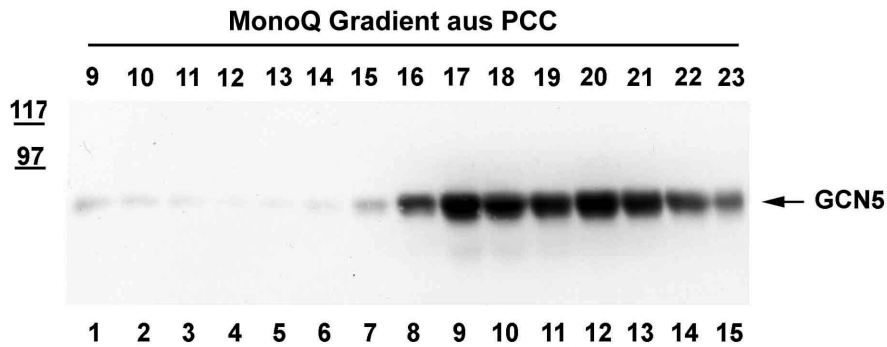


**Abb. 22a: Western Blot: Analyse eines MQ Gradienten mit anti Bdp1 Antikörpern**

Bahnen 1-19: 200 µl der MQ Fraktionen 7-25

8% SDS Trenngel; Membraninkubation mit anti Bdp1 Antikörper (1:400); Zweitantikörper:  $^{125}\text{I}$ -markierter anti rabbit Antikörper (1 µCi/ml)

Aufgrund der MALDI TOF Ergebnisse der TFIIC1<sub>high</sub> Aktivität und der funktionellen Austauschbarkeit von TFIIC1 und TFIIC1like sollte der MQ Gradient auch im Hinblick auf GCN5 und TRRAP im Western Blot untersucht werden (Abb. 22b und 22c). Möglicherweise sind diese Proteine oder eines der beiden für die TFIIC1like Aktivität verantwortlich. GCN5 konnte in den Fraktionen 9 und 15-23 nachgewiesen werden (Abb. 22b). Somit enthielten die TFIIC1like-aktiven Fraktionen 10-14 kein GCN5. Dagegen lagen die TFIIC1 Fraktionen (19-22) erwartungsgemäß im Bereich der GCN5-Elution. Auffällig war, dass GCN5 auch in solchen Fraktionen nachweisbar war, die direkt vor der TFIIC1 Aktivität von der MQ eluierten.

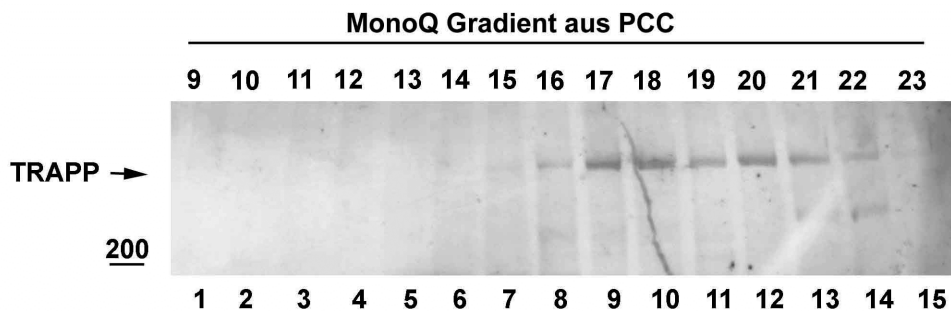


**Abb. 22b: Western Blot: Analyse eines MQ Gradienten mit anti GCN5 Antikörpern**

Bahnen 1-15: 200 µl der MQ Fraktionen 9-23

8% SDS Trenngel; Membraninkubation mit anti GCN5/PCAF Antikörper (1:400); Zweitantikörper: Peroxidase-markierter anti mouse Antikörper (1:2000)

Die Untersuchung des MQ Gradienten mit anti TRRAP Antikörpern (Abb. 22c) zeigte im Vergleich zur GCN5-Analyse ein ähnliches Bild. In den TFIIIC1-like-aktiven Fraktionen (10-14) konnte kein TRRAP nachgewiesen werden. Die TFIIIC1 Fraktionen 19-22 dagegen lagen im TRRAP Elutionsbereich (Fraktionen 15/16-22), wobei auch hier in Fraktionen, die direkt vor der TFIIIC1 Aktivität von der MQ Säule eluierten, TRRAP nachweisbar war. Somit konnte eine strenge Koelution von TRRAP und GCN5 beobachtet werden.

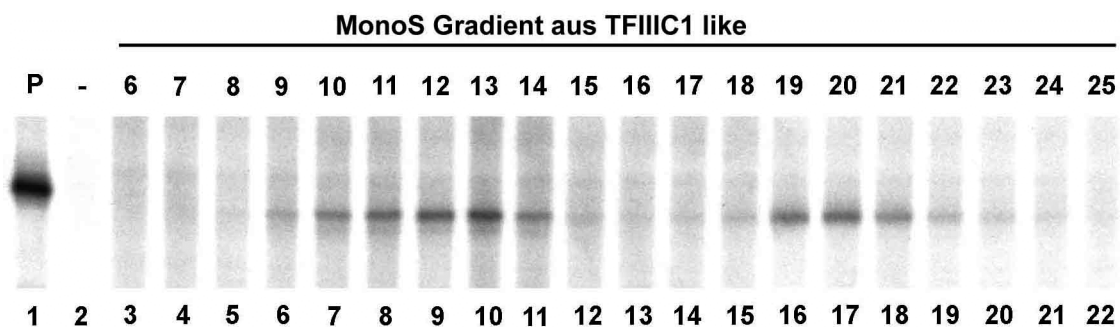


**Abb. 22c: Western Blot: Analyse eines MQ Gradienten mit anti TRRAP Antikörpern**

Bahnen 1-15: 200 µl der MQ Fraktionen 9-23

8% SDS Trenngel; Membraninkubation mit anti TRRAP Antikörper (1:400); Zweitantikörper: Peroxidase-markierter anti goat Antikörper (1:2000)

Die Analyse des MQ Gradienten ergab, dass TFNR, GCN5 und TRRAP nicht Bestandteil der TFIIIC1like-aktiven Fraktionen sind. Dennoch konnten verschiedene anti Bdp1 reaktive Proteine <200 kDa in den TFIIIC1like Fraktionen detektiert werden. Möglicherweise stellen diese Proteine die von Schramm und Teichmann beschriebenen 150-160 kDa Formen von hBdp1 dar. Ob diese Proteine für die TFIIIC1like Aktivität verantwortlich sind, sollte eine anschließende MonoS Chromatographie der MQ-TFIIIC1like Fraktionen klären (3.7.3.4). Der funktionelle Nachweis des TFIIIC1like-MonoS Gradienten in einem TFIIIC1-freien VAI Transkriptionssystem ist in der Abb. 23 dargestellt. Vergleichbar mit TFIIIC1 (Abb. 6) trennt sich auch die ursprüngliche MQ-TFIIIC1like Aktivität in zwei funktionell austauschbare TFIIIC1like-Subformen auf (Hafner, 2002). Während die erste Form (Fraktionen 10-14), ähnlich wie TFIIIC1<sub>low</sub>, bei 350 mM KCl eluierte, erfolgte die zweite Elution (Fraktionen 19-21) bei 450 mM KCl. In Anlehnung an die TFIIIC1-Nomenklatur wurden auch für die beiden TFIIIC1like-MonoS Eluate die Bezeichnungen TFIIIC1like<sub>low</sub> und TFIIIC1like<sub>high</sub> eingeführt.

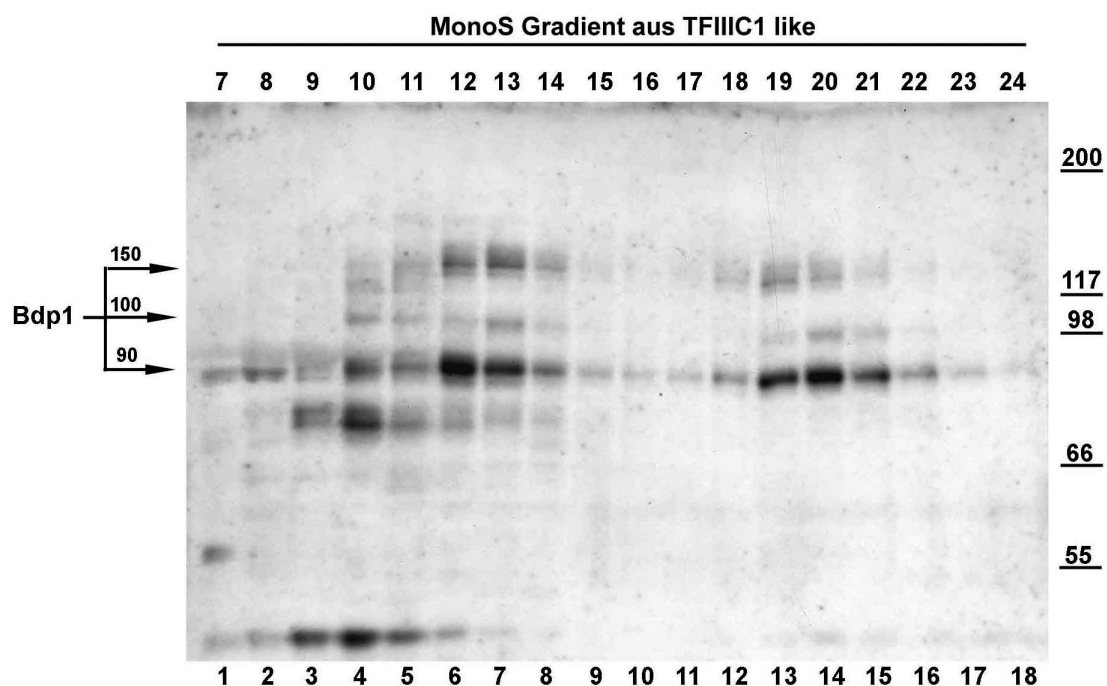


**Abb. 23: VAI *in vitro* Transkription: Test eines TFIIIC1like-MonoS Gradienten auf VAI Transkriptionsaktivität**

Bahnen 1-25: 5 µl MQ-TFIIIC2; 2,5 µl MQ-TFIIIBβ; 1 µl ssDNA Zellulose-Pol III; Bahn 1: 10 µl MQ-TFIIIC1like (Positivkontrolle); Bahn 2 dient als TFIIIC1like-freie Negativkontrolle; Bahnen 3-25: 7,5 µl der TFIIIC1like-MonoS Fraktionen 3-25; Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUVAI.

Anschließend wurden die Fraktionen des TFIIIC1like-MonoS Gradienten in einer Western Blot Analyse mit anti Bdp1 Antikörpern untersucht (Abb. 24). Die

beste Koelution mit den beiden TFIIIC1like Aktivitäten (Fraktionen 10-14 und 19-21) zeigte ein bei ca. 150 kDa laufendes Protein. Dabei überlappt der maximale Gehalt an diesem Protein exakt mit den Fraktionen der stärksten TFIIIC1like-Transkriptionsaktivität (TFIIIC1like<sub>low</sub>: Fraktionen 12/13; TFIIIC1like<sub>high</sub>: Fraktionen 19/20). Zwei weitere Proteine, die bei ca. 100 und 90 kDa laufen, zeigten ebenfalls eine gute Koelution mit den beiden TFIIIC1like Formen.



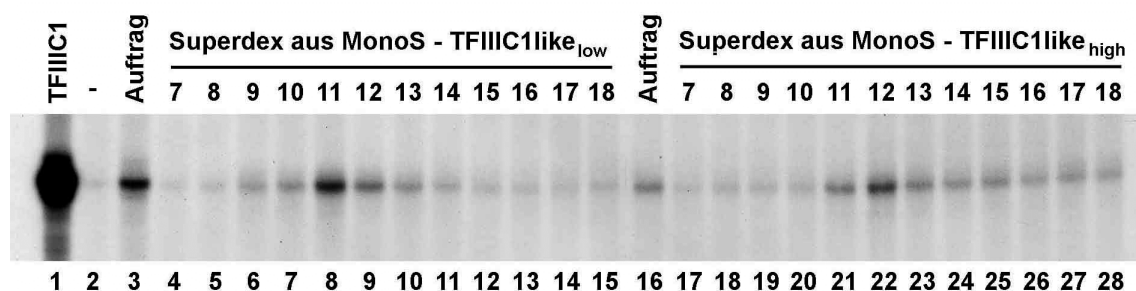
**Abb. 24: Western Blot: Analyse eines TFIIIC1like-MonoS Gradienten mit anti Bdp1 Antikörpern**

Bahnen 1-18: 250 µl der TFIIIC1like-MonoS Fraktionen 7-24

8% SDS Trenngel; Membraninkubation mit anti Bdp1 Antikörper (1:400); Zweitantikörper: <sup>125</sup>I-markierter anti rabbit Antikörper (1µCi/ml)

Die nahezu exakte Koelution des 150 kDa Proteins, welches vom Bdp1 Antikörper erkannt wurde, mit beiden TFIIIC1like Aktivitäten bekräftigte die Überlegung, dass die 150-160 kDa Bdp1 Form (Schramm und Teichmann) für die funktionelle Aktivität von TFIIIC1like verantwortlich ist. Um diese Ergebnisse zu untermauern, sollten die beiden TFIIIC1like Formen "low" und "high" in

Bezug auf ihre molekulare Größe per Gelfiltration charakterisiert werden. Dafür wurde, wie schon bei TFIIIC1, eine analytische Superdex 200 Chromatographie bei 200 mM KCl durchgeführt (3.7.2.3). Es wurden jeweils 200 µl der MonoS-Peak Fraktionen 13 und 20 (Abb. 23) auf die Säule geladen. Die Abb. 25 zeigt die VAI *in vitro* Transkription dieser Gelfiltrationen. Beide TFIIIC1like Formen eluierten mit Fraktion 11 von der Superdex 200, wobei das Aktivitätsmaximum für TFIIIC1like<sub>low</sub> in Fraktion 11 und für TFIIIC1like<sub>high</sub> in Fraktion 12 nachweisbar war. Entsprechende Vergleichschromatographien mit Eichproteinen ergaben, dass die TFIIIC1like Aktivitäten ein Molekulargewicht von 150-250 kDa aufweisen. Somit entspricht die TFIIIC1like Aktivität in etwa der molekularen Größe derjenigen Bdp1 Proteine, die von Schramm und Teichmann beschrieben worden sind.

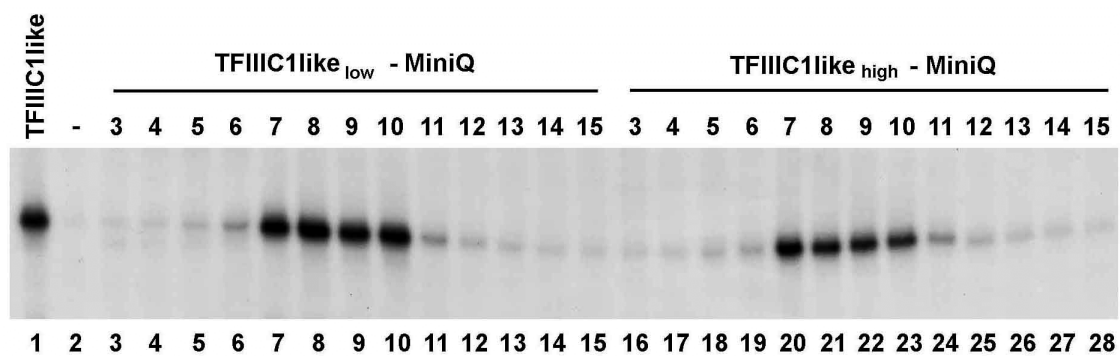


**Abb. 25: VAI *in vitro* Transkription: Test der TFIIIC1like<sub>low</sub> / <sub>high</sub> -Superdex 200 Fraktionen auf funktionelle Aktivität**

Bahnen 1-28: 5 µl MQ-TFIIIC2; 2,5 µl MQ-TFIIIBβ; 1 µl ssDNA Zellulose-Pol III; Bahn 1: 20 µl MQ-TFIIIC1 (Positivkontrolle); Bahn 2 dient als TFIIIC1like-freie Negativkontrolle; Bahnen 3 und 16: 10 µl MonoS-TFIIIC1like<sub>low</sub> / MonoS-TFIIIC1like<sub>high</sub>; Bahnen 4-15: 40 µl der TFIIIC1like<sub>low</sub> -Superdex 200 Fraktionen 7-18; Bahnen 17-28: 40 µl der TFIIIC1like<sub>high</sub> -Superdex 200 Fraktionen 7-18; Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUVAI.

Die bisherigen Untersuchungen zu TFIIIC1like führten wiederholt zu der Schlussfolgerung, dass die 150-160 kDa Bdp1 Formen für die Repräsentation der TFIIIC1like Aktivität verantwortlich sind. Den entgeltigen Beweis dafür sollte eine MALDI TOF Analyse einer entsprechend sauberen TFIIIC1like Präparation bringen. Für diese Analyse waren die Superdex 200 Fraktionen der Abb. 25 nicht geeignet, da sie noch zu viele Proteine enthielten (Daten nicht gezeigt).

Aus diesem Grund wurde mit den beiden MonoS-TFIIC1like Aktivitäten eine MiniQ Chromatographie durchgeführt. Dafür wurden die TFIIC1like<sub>low</sub> -bzw. die TFIIC1like<sub>high</sub> -aktiven MonoS Fraktionen auf 60 mM KCl verdünnt und gesondert auf die MiniQ Säule geladen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 60-300 mM KCl (3.7.3.6). In der Abb. 26 ist die VAI Transkription der TFIIC1like-MiniQ Gradienten zu sehen. Wie schon im Fall der TFIIC1 Aktivitäten beobachtet werden konnte, zeigten auch die beiden TFIIC1like Aktivitäten das gleiche chromatographische Verhalten auf der MiniQ Säule. Sowohl die TFIIC1like<sub>low</sub>, wie auch die TFIIC1like<sub>high</sub> Aktivität eluierte bei 120 mM KCl mit den Fraktionen 7-10 von der MiniQ. Damit lag der TFIIC1like-Elutionspunkt ca. 100 mM KCl vor dem TFIIC1-Elutionspunkt auf der MiniQ.



**Abb.26: VAI *in vitro* Transkription: Untersuchung des Elutionspunktes von TFIIC1like<sub>low</sub> und TFIIC1like<sub>high</sub> während der MiniQ Chromatographie**

Bahnen 1-28: 5 µl MQ-TFIIC2; 2,5 µl MQ-TFIIBβ; 1 µl ssDNA Zellulose-Pol III; Bahn 1: 10 µl MQ-TFIIC1like (Positivkontrolle); Bahn 2 dient als TFIIC1like-freie Negativkontrolle; Bahnen 3-15: 10 µl der TFIIC1like<sub>low</sub> -MiniQ Fraktionen 3-15; Bahnen 16-28: 10 µl der TFIIC1like<sub>high</sub> -MiniQ Fraktionen 3-15; Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUVAI.

Die 1 ml Fraktionen beider TFIIC1like-MiniQ Chromatographien wurden mit Strataclean<sup>TM</sup> Resin (3.6.11) konzentriert und auf ein SDS Gel geladen. Das silbergefärbte Gel wurde anschließend im Hinblick auf Polypeptide, welche die TFIIC1like Aktivitäten repräsentieren könnten, untersucht. Insgesamt war der Reinigungsgrad der TFIIC1like Aktivität-enthaltenden MiniQ Fraktionen für eine

MALDI TOF Analyse noch nicht ausreichend (Daten nicht gezeigt). Da TFIIC1like bei einer weiteren chromatographischen Reinigung (Superdex 200) eine hohe Instabilität aufwies und somit funktionell nicht mehr nachweisbar war (Daten nicht gezeigt), führte die TFIIC1like-Reinigung zu keiner MALDI TOF Analyse.

#### **Zusammenfassung:**

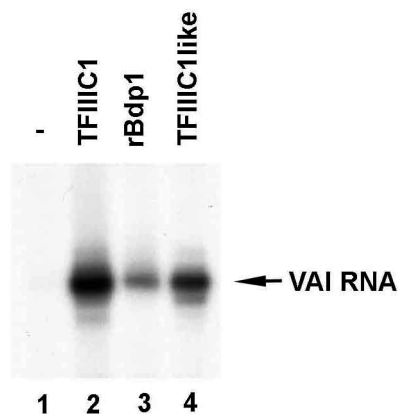
TFIIC1like wird weder durch GCN5 noch durch TRRAP repräsentiert. Dagegen konnten anti Bdp1 Antikörper ein bei 150 kDa laufendes Protein erkennen, welches exakt mit den beiden TFIIC1like Aktivitäten, TFIIC1like<sub>low</sub> und TFIIC1like<sub>high</sub>, koeluierte. Zwei weitere Banden bei ca. 100 und 90 kDa zeigten ebenfalls eine gute Koelution mit TFIIC1like. Aufgrund der Ergebnisse, dass die 220-250 kDa Formen von Bdp1, TFNR, mit der TFIIC1 Aktivität koeluierten, und die TFIIC1like Aktivitäten, im Gegensatz zu TFIIC1, mit einem nativen Molekulargewicht von 150-250 kDa von der Gelfiltration eluierten, kann davon ausgegangen werden, dass die TFIIC1like Aktivität durch die 150-160 kDa Form oder noch kleinere Formen von hBdp1 repräsentiert wird.

#### **4.4 TFIIC1, TFIIC1like und rekombinantes Bdp1 (TFIIB150) sind funktionell austauschbar**

Aufgrund der exakten Koelution der 220-250 kDa Varianten von TFNR mit den TFIIC1<sub>low</sub> und TFIIC1<sub>high</sub> Aktivitäten, der guten Koelution kleinerer Bdp1-Formen (150, 100 und 90 kDa) mit den beiden TFIIC1like Aktivitäten sowie der vollständigen Depletion der TFIIC1 Aktivität mit anti Bdp1 Antikörpern sollte nun getestet werden, ob rekombinantes (r)Bdp1 in der Lage ist, die TFIIC1 oder TFIIC1like Aktivität in der VAI bzw. U6 *in vitro* Transkription zu ersetzen (Abb. 27).

Durch die bestehende Zusammenarbeit mit Dr. M. Teichmann wurde unserem Labor für diesen Nachweis freundlicherweise die 150 kDa rBdp1-Form (Material) zur Verfügung gestellt. Die Abb. 27a zeigt die funktionelle Austauschbarkeit von TFIIC1 (Bahn 2), TFIIC1like (Bahn 4) und rBdp1 (Bahn 3) in einem TFIIC1-freien, rekonstituierten Transkriptionssystem (Bahn 1) am

VAI Gen. Die Transkriptions-effizienz von rekombinantem Bdp1 (TFIIIB150) war im Vergleich zu TFIIIC1/TFIIIC1like geringer, dennoch ist rBdp1 in der Lage, das TFIIIC1-freie VAI System funktionell zu vervollständigen. Außerdem konnte die Zugabe von rBdp1 zum cytoplasmatischen Extrakt (S100), welcher alle Pol III Transkriptionsfaktoren enthält und somit alleine zu einer effizienten RNA Synthese *in vitro* führt, die VAI Transkription um den Faktor 2-2,5 stimulieren (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung konnte auch durch die Zugabe von TFIIIC1 gemacht werden.



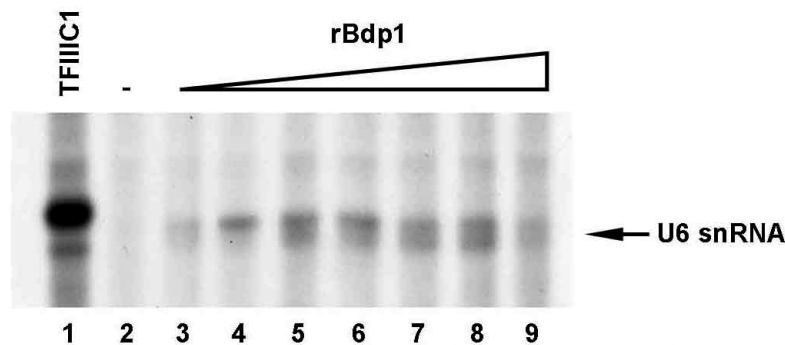
**Abb. 27a: *In vitro* Transkription: Funktioneller Austausch von TFIIIC1, TFIIIC1like und rekombinantem Bdp1 (150 kDa) am VAI Gen**

Bahnen 1-4: 5  $\mu$ l MQ-TFIIIC2; 2,5  $\mu$ l MQ-TFIIIB $\beta$ ; 1  $\mu$ l ssDNA Zellulose-Pol III; Bahn 1 dient als TFIIIC1-freie Negativkontrolle; Bahn 2: 10  $\mu$ l MQ-TFIIIC1; Bahn 3: 1,5  $\mu$ l (9 ng) rBdp1; Bahn 4: 10  $\mu$ l MQ-TFIIIC1like; Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUVAI.

Am U6 Gen konnte rBdp1 (TFIIIB150) die Transkriptionseffizienz des S100 Systems um den Faktor 2,2 verstärken (Daten nicht gezeigt), was vergleichbar mit der Beobachtung am VAI Gen ist. Die Abb. 27b zeigt die Titration von rBdp1 (Bahnen 3-9) zum rekonstituierten TFIIIC1-freien U6 Transkriptionssystem (Bahn 2). Dabei war zu beobachten, dass 18 ng rBdp1 zur stärksten Rekonstitution der U6 Transkription führten und größere Mengen (24 ng, Bahn 9; 60 ng nicht gezeigt) die Transkription hemmten. Somit ist rBdp1 auch am 5'-regulierten U6-Promotor mit TFIIIC1 funktionell austauschbar, obwohl auch hier beobachtet werden konnte, dass die Zugabe einer MQ-TFIIIC1 Fraktion (Bahn



1) im Vergleich zu rBdp1 zu einer wesentlich stärkeren Transkriptionseffizienz führt.



**Abb. 27b: *In vitro* Transkription: Untersuchung von rBdp1 (150 kDa) auf TFIIIC1-Transkriptionsaktivität am U6 Gen**

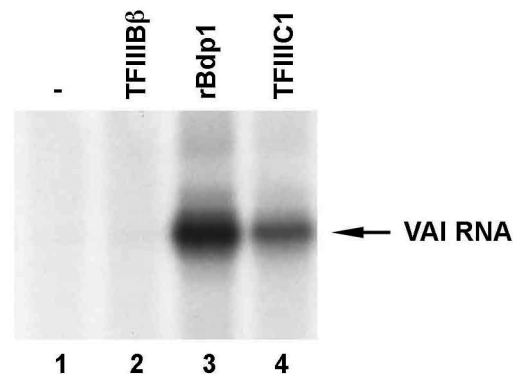
Bahnen 1-9: 2 µl rTBP; 2,5 µl (Re)MQ-PBP; 5 µl Superdex 200-Brf2 (Fraktion 15 aus Abb. 3a); 1 µl ssDNA Zellulose-Pol III; Bahn 1: 20 µl (Re)MQ-TFIIIC1; Bahn 2 dient als TFIIIC1-freie Negativkontrolle; Bahnen 3-9: 3-24 ng rBdp1; Alle Transkriptionsansätze enthielten 500 ng pUmU6.

#### **4.5 TFIIIC1-inaktive Extrakte differenzierter F9 Zellen enthalten kein TFNR**

Frühere Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass der vollständige Verlust der Pol III Transkriptionsaktivität während der Differenzierung von F9 Embryonalen Carcinomazellen (EC) zu F9 Parietalen Endodermzellen (PE) auf den Verlust an TFIIIC1 Aktivität in den F9 PE-Extrakten zurückzuführen ist (Meißner et al., 2002). Demnach spielt TFIIIC1 während des Differenzierungsprozesses von F9 EC-Zellen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Pol III Transkription.

Da rekombinantes Bdp1 (150 kDa) in der Lage war, die TFIIIC1 Aktivität in der rekonstituierten Pol III Transkription *in vitro* zu ersetzen, sollte untersucht werden, ob rBdp1 auch die Pol III Transkription in funktionell inaktiven, cytoplasmatischen F9 PE Extrakten rekonstituieren kann. Wie in der Abb. 28a zu sehen ist, war der F9 PE-S100 Extrakt für die Pol III *in vitro* Transkription inaktiv (Bahn 1) und erst die Zugabe von TFIIIC1 (Bahn 4), aber nicht von MQ-TFIIIB $\beta$  (TBP/Brf1-Komplex) (Bahn 2), führte zu einer effiziente VAI

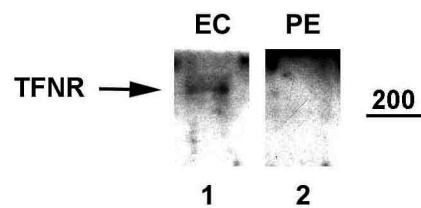
Transkription. Übereinstimmend mit den bisher präsentierten Ergebnissen über die funktionelle Austauschbarkeit von TFIIIC1 und rBdp1, war rBdp1 in der Lage, die Pol III Transkription in cytoplasmatischen F9 PE Extrakten zu rekonstituieren (Bahn 3).



**Abb. 28a: *In vitro* Transkription: Zugabe von rBdp1 zum funktionell inaktiven F9 PE-S100 Extrakt**

Bahnen 1-4: 30 µg cytoplasmatischer Extrakt (S100) aus differenzierten F9 parietalen Endoderm-zellen; Bahn 2: 5 µl MQ-TFIIIBβ; Bahn 3: 9 ng rBdp1; Bahn 4: 10 µl MQ-TFIIIC1; Alle Transkriptions-ansätze enthielten 500 ng pUVAI.

An dieser Stelle sollte analysiert werden, ob der Verlust der TFIIIC1 Aktivität in differenzierten F9 PE Extrakten mit dem Verlust an TFNR zu erklären ist. Dafür wurde eine TFIIIC1 Aktivität-enthaltende F9 EC-Fraktion, welche über Phosphozellulose und MQ gereinigt worden ist, mit einer entsprechend gereinigten, TFIIIC1-inaktiven F9 PE-Fraktion verglichen (Meißner et al., 2002). Die Abb. 28b zeigt die Western Blot Analyse dieser Fraktionen mit Antikörpern gegen Bdp1. Während in der TFIIIC1-aktiven F9 EC-Fraktion (Bahn 1) TFNR nachweisbar war, konnte in der TFIIIC1-inaktiven F9 PE-Fraktion (Bahn 2) kein TFNR detektiert werden. Somit korreliert die Inaktivierung von TFIIIC1 in F9 Zellen während der Differenzierung zu parietalen Endodermzellen mit dem Verlust oder Abbau an Bdp1 (TFNR).



**Abb. 28b: Western Blot: Untersuchung von funktionell charakterisierten F9 EC- und F9 PE-Fraktionen mit anti Bdp1 Antikörpern**

Bahnen 1 und 2: 200  $\mu$ l einer MQ Fraktion (260 mM KCl); die MQ Fraktionen entstanden durch Chromatographie per Phosphozellulose und MQ aus Extrakten von F9 embryonalen Carcinomazellen, welche TFIIIC1 Aktivität aufweisen (EC, Bahn 1) bzw. von differenzierten F9 parientalen Endoderm-zellen, die TFIIIC1-inaktiv sind (PE, Bahn 2)

8% SDS Trenngel; Membraninkubation mit anti Bdp1 Antikörper (1:400); Zweitantikörper:  $^{125}$ I-markierter anti rabbit Antikörper (1 $\mu$ Ci/ml)

## 5 Diskussion

Die humane Transkriptionsaktivität TFIIIC1 wurde erstmalig vor mehr als 15 Jahren von Berk und Mitarbeitern (Yoshinaga et al., 1987; Dean und Berk, 1987) beschrieben. Die molekulare Zusammensetzung dieser Aktivität blieb unbekannt. Drei wesentliche Aspekte belegen eine zentrale Rolle von TFIIIC1 innerhalb der RNA Polymerase III Transkription:

- TFIIIC1 ist neben TBP der einzige Faktor, welcher für die Transkription aller Polymerase III Gene essentiell benötigt wird (Yoshinaga et al., 1987; Yoon et al., 1995; Oettel et al., 1997).
- TFIIIC1 ist für die Rekrutierung der Polymerase III an den Promotor und somit für die Initiation der Transkription verantwortlich (Kober et al., 1998; Wagner, 2002; Weser et al., 2003).
- Die dramatische Verminderung der Pol III Expression während der G0-Phase in primären Lungenfibroblasten (WI-38) sowie während der Differenzierung von F9 embryonalen Carcinomazellen ist auf das Fehlen der TFIIIC1 Aktivität zurückzuführen (Härtel, 1999; Meißner et al., 2002).

Ungewöhnlicherweise konnten neben TFIIIC1 zwei weitere Aktivitäten, TFIIIC1' und TFIIIC1like, beschrieben werden, die funktionell mit TFIIIC1 vergleichbar sind. In ihrem chromatographischen Verhalten unterscheiden sich die drei Aktivitäten jedoch voneinander (Wang und Roeder, 1996; Oettel et al., 1997; Oettel et al., 1998). Zusätzlich führt die Chromatographie über MonoS zur Trennung von TFIIIC1 wie auch von TFIIIC1like in jeweils zwei funktionell austauschbare Formen (Hafner, 2002). Demnach existieren also fünf verschiedene humane TFIIIC1-Formen mit vergleichbarer Aktivität. Aufgrund dieser Diversität und der Schlüsselrolle von TFIIIC1 bei der Regulation der humanen Pol III Expression war es wichtig die Polypeptid-Zusammensetzung von TFIIIC1 zu analysieren.

### **5.1 Die chromatographische Reinigung von TFIIIC1 führt zur MALDI TOF Analyse**

Für die Identifizierung der Polypeptid-Zusammensetzung von TFIIIC1 sollten die TFIIIC1-aktiven Fraktionen über mehrere chromatographische Schritte gereinigt und per MALDI TOF Analyse untersucht werden. Der Grund, weshalb dieses Vorhaben zuvor nicht gelungen war, liegt vermutlich in der äußerst hohen mechanischen und oxidativen Instabilität von TFIIIC1, welche zu einem Verlust von Transkriptionsaktivität bei den einzelnen Schritten der Reinigung führte. Durch effizientes Entgasen und direkter Zugabe von DTT vor Gebrauch sämtlicher verwendeter Puffer konnte dieses Problem erfolgreich minimiert werden. Da TFIIIC1 ein sehr selten in der Zelle vorkommender Faktor ist (s. 5.5), war es zudem erforderlich eine sehr große Menge an cytoplasmatischem Extrakt als Ausgangsmaterial zu verwenden (ca. 0,7-1 g). Des weiteren erforderte die relativ starke unspezifische Interaktion von TFIIIC1 mit dem Trägermaterial von Gelfiltrationssäulen eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 200 mM im Chromatographiepuffer (s. 4.2.1.2). Eine entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche präparative Gelfiltration bildete der vorangegangene Reinigungsschritt über den Anionentauscher MiniQ, da er gleichzeitig der Konzentrierung der TFIIIC1-Fraktionen diente. Aufgrund seines sehr großen Stokes Radius eluierte TFIIIC1 während der Gelfiltration weit vor dem größten Teil der anderen Proteine, was den letzten Reinigungsschritt über Superdex 200 äußerst effizient machte. Mittels MALDI TOF konnte so erstmals eine Analyse der Polypeptid-Zusammensetzung einer weitgereinigten TFIIIC1 Fraktion erfolgen. Zudem hat sich die Technik der MALDI TOF Analyse in den letzten Jahren so stark verbessert, dass es mittlerweile möglich ist aus sehr geringen Proteinmengen eine Analyse zu erstellen.

Laut MALDI TOF enthielt die untersuchte TFIIIC1<sub>high</sub>-Präparation Proteine, die Bestandteile von HAT-Komplexen sind (TRRAP, GCN5 und PCAF assoziierter Faktor 65 beta). Verschiedene Experimente konnten aber keinen konkreten Anhaltspunkt liefern, dass diese Proteine für die TFIIIC1 Aktivität verantwortlich sind (s. 4.2.3; 4.2.4). Weiterhin enthielt die analysierte TFIIIC1 Fraktion Proteine, für die keine Beteiligung an der Pol III Transkription beschrieben

wurde (CDC42-binding protein kinase beta) bzw. gar keine Funktion bekannt ist (Protein KIAA0052 und hypothetisches Protein DKFZp434F2427.1).

Das einzige durch die MALDI TOF Analyse identifizierte Polypeptid, das mit einem an der Pol III Transkription beteiligten Polypeptid Homologien aufweist, ist das als "Transcription Factor-like Nuclear Regulator" bezeichnete Protein TFNR. Der N-Terminus dieses 250 kDa Proteins ist über 846 Aminosäuren mit dem 150-160 kDa Protein Bdp1 (hB", TFIIIB150) identisch, das als basaler Pol III Transkriptionsfaktor und Bestandteil der humanen TFIIIB Aktivitäten beschrieben wurde (Schramm et al., 2000; Teichmann et al., 2000). Es war daher naheliegend, dass dem größeren verwandten Protein TFNR ebenfalls eine Funktion im Pol III Transkriptionskomplex zukommt. Im Folgenden wurde daher überprüft, ob dieses Protein für die TFIIIC1 Aktivität verantwortlich ist.

## **5.2 Bdp1 ist die zentrale Komponente der Aktivitäten TFIIIC1 und TFIIIC1like**

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Bdp1 Bestandteil der TFIIIC1- und TFIIIC1like-Fraktionen ist. Bisher wurden die als funktionell aktiv beschriebenen Bdp1-Formen (hB", Schramm et al., 2000; TFIIIB150, Teichmann et al., 2000; Abb. 12) keiner konventionell gereinigten Pol III Transkriptionsaktivität zugeordnet. Interessanterweise koeluieren verschiedene Bdp1-Formen mit den Transkriptionsaktivitäten TFIIIC1 und TFIIIC1like. Die aufgrund der MALDI TOF Ergebnisse durchgeführten Western Blot Analysen sowie die Immunodepletion ergaben, dass die 220-250 kDa-Formen von Bdp1 (TFNR) mit der TFIIIC1 Aktivität exakt koeluieren (s. 4.2.2; 4.2.4). Im Vergleich dazu konnten in den Fraktionen der TFIIIC1like Aktivität kleinere Bdp1-Varianten von 90, 100 und 150 kDa im Western Blot nachgewiesen werden (s. 4.3). Im Fall der TFIIIC1 Aktivität bildet TFNR mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Komplex (s. 5.4). Dagegen wird TFIIIC1like vermutlich durch die kleineren Bdp1-Formen alleine repräsentiert. Bdp1 spielt also die zentrale Rolle innerhalb der verschiedenen TFIIIC1 Aktivitäten. So ist die kleinste der bisher bekannten Bdp1-Varianten (TFIIIB150, Teichmann et al.,

2000) als rekombinantes Protein in der Lage, TFIIIC1 bzw. TFIIIC1like in der Pol III *in vitro* Transkription funktionell zu ersetzen. Diese Beobachtung konnte sowohl am klassischen VAI- wie auch am 5' regulierten U6-Promotor gemacht werden (s. 4.4). Mit dieser Erkenntnis ist es gelungen für die 250 kDa-Form von Bdp1 (TFNR) eine Funktion als essentiell benötigte Pol III Transkriptionsaktivität zu zeigen. Zudem ist die Austauschbarkeit von TFIIIC1 mit Bdp1 eine Erklärung dafür, warum Hu et al. (2003) in der Lage waren, mit einem Transkriptionssystem, welches keine gereinigte TFIIIC1 Fraktion jedoch rekombinantes Bdp1 (hB'', Abb. 12) enthielt, eine effiziente U6 *in vitro* Transkription zu rekonstituieren.

Da die in den Austauschexperimenten verwendete rBdp1-Form (s. 4.4) lediglich den N-terminalen Bereich von Bdp1 beinhaltet (s. Abb. 12), stellt sich der Bdp1-N-Terminus als derjenige Teil des Proteins heraus, welcher für die basale Transkription essentiell benötigt wird. Dagegen ist die Funktion der Wiederholungsmotive und des C-terminalen Bereiches bisher völlig ungeklärt. Innerhalb des N-Terminus bildet eine SANT-Domäne (s. 5.4) sowie deren upstream- und downstream-Sequenzen den konservierten Bereich von Bdp1 (Schramm et al., 2000; Kelter et al., 2000). In der Hefe konnte mit Hilfe von yBdp1-Deletionsmutanten gezeigt werden, dass ein bestimmter Abschnitt innerhalb des konservierten Bdp1-Bereichs für die upstream-Promotoröffnung als erster Schritt zur "open komplex formation" essentiell ist, wodurch yBdp1 eine wesentliche Rolle für die Initiation einnimmt (Kassavetis et al., 2001). Es ist anzunehmen, dass diese Funktion im humanen Homolog ebenfalls durch den konservierten Bdp1-Bereich ausgeübt wird, da dieser in allen bisher beschriebenen hBdp1-Varianten enthalten ist.

### **5.2.1 Anti Bdp1 reaktive Proteine, die keine Pol III Transkriptionsaktivität zeigen**

Der gegen Bdp1 gerichtete Antikörper erkannte eine Reihe anderer Proteine, die nicht mit TFIIIC1like oder TFIIIC1 koeluierten. Zudem enthielt eine typische TFIIIU Fraktion eine große Anzahl anti Bdp1 reaktiver Proteine zwischen 90 und 150 kDa (s. 4.1.1), die nach vollständiger Abtrennung von Brf2 weder

TFIIIC1/TFIIIC1like Aktivität aufwiesen (s. 4.2.5), noch ein vollständig rekonstituiertes *in vitro* Transkriptionssystem zusätzlich stimulieren konnten (s. 4.1.2). Möglicherweise handelt es sich bei solchen anti Bdp1 reaktiven Proteinen um inaktive Bdp1-Formen oder diese Proteine stellen gar keine Bdp1-Proteine dar, sondern werden über Sequenzähnlichkeiten vom anti Bdp1 Antikörper erkannt. Solche Sequenzähnlichkeiten könnten in einer möglichen SANT-Domäne dieser Proteine liegen, da der verwendete Bdp1 Antikörper unter anderem gegen die SANT-Domäne von Bdp1 gerichtet ist (s. Material).

### **5.3 Die Existenz verschiedener hBdp1-Varianten stellt einen möglichen Regulationsmechanismus dar**

Während TFIIIC1 mit der 250 kDa Variante von hBdp1 (TFNR) koeluiert, sind für die Funktion der TFIIIC1like Aktivität mit hoher Wahrscheinlichkeit kleinere hBdp1-Formen von 90-150 kDa verantwortlich. Diese stellen höchstwahrscheinlich die von Schramm und Teichmann beschriebenen hBdp1-Formen dar (hB'' und TFIIIB150, Abb. 12). Über die Ursache warum im humanen System so viele verschiedene Bdp1-Varianten nachweisbar sind, kann bisher nur spekuliert werden. Interessant ist jedoch, dass Kelter et al. (2000) verschiedene hBdp1-kodierende mRNAs in Northern Blot Analysen detektieren konnten. Die Autoren diskutierten die kleineren mRNA Transkripte als alternative Spleißing-Produkte oder verkürzte Kopien. Zudem konnten Kelter et al. auf Proteinebene eine Gewebe-spezifische Verteilung unterschiedlicher anti Bdp1-kreuzreaktiver Proteine zeigen, welche potentielle TFNR-Varianten (55-250 kDa) darstellen. Dabei war besonders das vollständige Fehlen der 250 kDa-Form im adulten Muskel im Vergleich zur fetalen Muskelzelle auffällig. Diese Beobachtung lässt auf eine mögliche Gewebe-spezifische Expression von unterschiedlichen hBdp1-Formen schließen. Somit könnten die verschiedenen humanen Bdp1-Formen Zelltyp-spezifische *in vivo* Funktionen ausüben. Möglicherweise werden diese Funktionen aber auch über die Interaktion mit anderen Proteinen gesteuert.



#### **5.4 Bildet die 250 kDa-Form von hBdp1 (TFNR) möglicherweise einen Komplex mit anderen Proteinen?**

Die Beobachtung, dass TFIIC1 bzw. TFNR mit einem Molekulargewicht von mehr als 680 kDa von einer Gelfiltrationssäule eluiert (s. 4.2.1.2), lässt auf eine Assoziation von TFNR mit anderen Proteinen schließen. Solche Interaktionen sind zum Beispiel mit dem C-Terminus von TFNR denkbar, da die kleineren hBdp1-Formen der TFIIC1like-aktiven Fraktionen, die ihrer molekularen Größe entsprechend mit 150-250 kDa bei der Gelfiltration eluieren (s. 4.3) und somit höchstwahrscheinlich als einzelne Proteine vorliegen, den C-terminalen Bereich von TFNR nicht aufweisen.

In der MALDI TOF Analyse der Superdex 200-TFIIC1<sub>high</sub> Präparation konnten neben der 250 kDa-Form von Bdp1 (TFNR) sechs weitere Proteine identifiziert werden, welche mit TFNR assoziiert vorliegen könnten (s. 4.2.1.3; Tab. 1). Eine entsprechende Analyse der Proteine KIAA0052 und DKFZ-p434F2427.1 wurde bisher nicht durchgeführt, da für diese Proteine keinerlei Funktion bekannt ist. Auffällig waren die Proteine GCN5, TRRAP und der PCAF assoziierte Faktor 65 beta, da es sich hierbei um Proteine handelte, welche in "Mediator"-Komplexen vorliegen und über die GCN5-Histon-Acetyltransferase (HAT) Aktivität an der Regulation der Polymerase II Transkription beteiligt sind (Review: Sterner und Berger, 2000). Zudem konnte auf Ebene der MQ-Chromatographie eine exakte Koelution von GCN5 mit TRRAP nachgewiesen werden, was auf einen großen "Mediator"-Komplex schließen ließ (s. 4.3). Da dieser GCN5-TRRAP-Komplex zum Teil mit der MQ-TFIIC1 Aktivität koeluierte (s. 4.3), schien es sinnvoll, eine potentielle TFNR-Assoziation mit einem solchen "Mediator"-Komplex zu untersuchen. Die Immunodepletion einer TFIIC1 Fraktion mit anti Bdp1 Antikörpern ließ vorerst nicht auf eine Koimmunodepletion von GCN5 mit TFNR schließen, da in den TFNR-depletierten Durchbrüchen keine Herabsetzung der GCN5-Menge sichtbar war (s. 4.2.4). Dies könnte aber auch mit der Beobachtung erklärt werden, dass GCN5 im Vergleich zu TFNR ein sehr häufig vorkommendes Protein ist, wodurch der Nachweis einer kleinen etwaigen kodepletierten GCN5-Menge schwierig wäre. Da Bdp1 innerhalb des konservierten Bereiches eine SANT-Domäne aufweist (Schramm et al., 2000; Kelter et al., 2000), welche ursprünglich in den Hefe Proteinen Swi3, Ada2,

NcoR und TFIIB B" (yBdp1) gefunden worden ist und somit eine Gruppe von Proteinen repräsentiert, welche an der Regulation der Transkription beteiligt sind (Aasland et al., 1996), ist eine Protein-Protein-Interaktion über die Bdp1-SANT-Domäne prinzipiell nicht auszuschließen. Beispielsweise interagieren die Hefe-Proteine Ada2 und NcoR über ihre SANT-Domäne mit der Acetylase GCN5 bzw. mit der Deacetylase HDAC3 (Guenther et al., 2001; Sterner et al., 2002). Ob eine potentielle TFNR-GCN5 Interaktion tatsächlich über die Bdp1-SANT-Domäne vermittelt wird, bleibt zu untersuchen. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die SANT-Domäne in allen beschriebenen hBdp1-Formen konserviert ist (s. Abb. 12), die TFIIC1like-aktiven Fraktionen, welche mit kleineren hBdp1-Varianten koelutieren, aber kein GCN5 enthielten. Generell müsste einer möglichen Regulationsfunktion eines TFNR-GCN5 Komplexes als "Mediator" ein anderer Mechanismus der Transkriptionsaktivierung zu Grunde liegen, als das im Pol II-System der Fall ist, da die genintern regulierten Pol III Gene kein konserviertes stromaufwärts gelegenes Enhancer-Element aufweisen. In jedem Fall aber sind Histon-Acetyltransferase Aktivitäten auch für Faktoren der "klassischen" Pol III Gene beschrieben worden. Die 90, 110 und 220 kDa Untereinheiten von TFIIC2 weisen HAT Aktivität auf (Hsieh et al., 1999b; Kundu et al., 1999). Natürlich könnte eine potentielle Bdp1-GCN5 Interaktion auch der Acetylierung von Bdp1 dienen. Dies ist vorstellbar, da GCN5 neben Histonen auch andere Proteine acetylieren kann (Pollard und Peterson, 1997; Armstrong und Emerson, 1998). Somit könnte neben einer möglichen Phosphorylierung (Schramm et al., 2000) auch eine Acetylierung der verschiedenen hBdp1-Formen eine posttranslationale Modifizierung darstellen. Möglicherweise bilden diese hBdp1-Modifizierungen die molekulare Grundlage der "low/high"-Trennung von TFIIC1 und TFIIC1like (s. 4.2.1; 4.3), da zwischen den "low/high"-Subformen innerhalb der jeweiligen Aktivität kein Unterschied bezüglich der Koelution mit den entsprechenden hBdp1-Varianten festgestellt werden konnte (s. 4.2.2; 4.3).

Gegen eine TFIIC1-Komplex These sprechen die Daten von Yoshinaga et al. (1987), nach denen TFIIC1 mittels Sucrosegradienten-Zentrifugation eine molekulare Größe von ca. 200 kDa zugeordnet wurde. Weitere Erklärungs-möglichkeiten für das Verhalten von TFIIC1 während der Gelfiltration könnten

in einer ungewöhnlichen Molekülform (nicht globulär) oder in einer Oligomerisierung von TFNR liegen.

### 5.5 Bdp1 stellt den limitierenden Faktor der Pol III Transkription dar

Yoshinaga et al. (1987) beschrieben TFIIIC1 als limitierende Aktivität der Pol III Transkription, da nur TFIIIC1 in der Lage war, ein bereits effizient transkribierendes Rekonstitutionssystem, bestehend aus PCB- und PCC-Fraktionen, zusätzlich zu stimulieren. Die Beobachtung, dass rBdp1 (rTFIIIB150) die Pol III *in vitro* Transkription in transkriptionsaktiven HEK-Extrakten verstärken konnte (Daten nicht gezeigt), liefert ein weiteres Indiz, TFIIIC1 bzw. Bdp1 als limitierenden Faktor *in vitro* zu beschreiben. Zudem scheint hBdp1 im Vergleich zu den anderen Pol III Transkriptionsfaktoren in sehr geringen Mengen in der HEK-Zelle vorzuliegen, da die funktionellen hBdp1-Formen der TFIIIC1- und TFIIIC1like Fraktionen per Western Blot erst detektierbar waren, nachdem ein vergleichsweise ungewöhnlich großes Volumen an diesen Fraktionen eingesetzt wurde (s. 4.2.2).

In ruhenden, in G0 arretierten Lungenfibroblasten (Härtel, 1999) sowie während der Zelldifferenzierung von F9 Embryonalen Carcinomazellen zu F9 Parietalen Endodermzellen (PE) (Meißner et al., 2002) stellt TFIIIC1 den limitierenden Pol III Faktor dar. Während Meißner et al. (2002) die Inaktivierung der Pol III Transkription während der F9 Zelldifferenzierung auf das Fehlen der TFIIIC1 Aktivität zurückführten, begründeten Alzuherri und White (1998) die Inaktivierung mit der fehlenden "TFIIIB" Aktivität, da eine "TFIIIB" Fraktion in der Lage war, die differenzierten F9 PE Extrakte zu stimulieren. Alzuherri und White berücksichtigten jedoch nicht die von Wang und Roeder (1996) beschriebene TFIIIC1' Aktivität in der PCB Fraktion, welche den Ausgangspunkt für die Reinigung der von ihnen verwendeten "TFIIIB" Fraktion darstellte. Dagegen konnten Meißner et al. zeigen, dass nach Entfernung dieser TFIIIC1'-Kontamination die resultierende TFIIIB $\beta$ -Fraktion nicht in der Lage war den transkriptionsinaktiven F9 PE-Extrakt am VAI Gen zu reaktivieren. Ausschließlich die TFIIIC1 bzw. TFIIIC1like Fraktionen, welche sowohl TFIIIB $\beta$ - wie auch TFIIIC2-frei waren, konnten die fehlende Transkriptionsaktivität ersetzen.

Die funktionelle Austauschbarkeit von TFIIIC1 mit rBdp1 (TFIIIB150) und die Beschreibung, dass sowohl TFIIIB $\alpha$  wie auch TFIIIB $\beta$  mit Bdp1 lose assoziiert sind (Schramm et al., 2000; Teichmann et al., 2000; Cabart und Murphy, 2002), führen zu der Vorstellung, dass die von Alzuherri und White verwendete "TFIIIB" Fraktion Bdp1 enthielt. Da ausschließlich die TFIIIC1-Aktivitäten bzw. rBdp1 (TFIIIB150), nicht aber der TBP-Brf1 Komplex TFIIIB $\beta$  in der Lage sind, die fehlende Aktivität in F9 PE-Extrakten zu ersetzen (s. 4.5; Meißner et al., 2002), ist festzustellen, dass im Gegensatz zur Interpretation von Alzuherri und White weder TBP noch Brf1 in ihrer Aktivität während der F9 Zelldifferenzierung reguliert werden.

Eine mögliche Erklärung für die Regulation von Bdp1 könnte in der raschen Degradation von TFIIIC1 liegen. Interessanterweise ergab eine Analyse des "PESTfind" Programms (EMBnet Austria; Rogers et al., 1986; Rechsteiner und Rogers, 1996), dass alle drei hBdp1-Abschnitte (N-Terminus, repeats, C-Terminus) potentielle PEST-Domänen tragen (Daten nicht gezeigt). PEST-Domänen beschreiben Prolin (P)-, Glutamin (E)-, Serin (S)- und Threonin (T)-reiche Regionen, welche als proteolytische Erkennungssignale dienen, beispielsweise für Ubiquitin, und somit für den Proteasomabbau markiert werden (Rechsteiner und Rogers, 1996; Gillessen et al., 2002). Die entsprechende Analyse für TBP und Brf1 zeigte keine möglichen PEST-Domänen. Es ist daher vorstellbar, dass hBdp1 über diese Domänen per Ubiquitin-vermittelten Proteasomabbau inaktiviert wird und deshalb die inaktiven Extrakte aus differenzierten F9 PE-Zellen nachweislich kein Bdp1 (TFNR) enthielten (s. 4.5).

Diese Beobachtungen lassen TFIIIC1/hBdp1 als einen zentralen Angriffspunkt bei der Regulation der Pol III-Genexpression erscheinen. Beispielsweise zeigte eine Genom-weite Untersuchung der Hefe *S. cerevisiae* (per "ChIP on chip" Technik) zur Okkupierung von Pol III Genen durch den Pol III Transkriptionsapparat, dass die Polymerase III und größtenteils auch yBdp1 während der stationären Wachstumsphase vom Promotor dissoziieren (yTBP und yBrf1 wurden in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt). Dagegen bleibt yTFIIIC an den meisten Pol III Genen gebunden (Harismendy et al., 2003). Möglicherweise sichert sich die Zelle eine partielle Promotorokkupierung, indem yTFIIIC

generell und  $\gamma$ TFIIIB in einigen Fällen am Promotor gebunden bleiben, falls geeignete Wachstumsbedingungen eintreten, welche eine schnellstmögliche Wiederaufnahme der Pol III Transkription erfordern. Eine vergleichbare Beobachtung wurde für die Pol III-Repression während der Mitose-Phase im humanen System beschrieben. Fairley et al. (2003) konnten per "ChIP assay" zeigen, dass weder die Polymerase III noch Bdp1 an kondensierten Metaphase-Chromosomen gebunden sind. Dagegen bleiben TFIIIC2, TBP und Brf1 am Promotor assembliert. Die Autoren argumentierten, dass eine Mitose-bedingte Hyperphosphorylierung von Brf1, welche keinen Einfluss auf dessen Promotorassemblierung ausübt, die Brf1-Bdp1 Interaktion hemmt. Dies könnte bedeuten, dass Bdp1 nicht rekrutiert wird.

## 5.6 Bdp1 im Vergleich: Hefe-Mensch

Über seinen konservierten N-Terminus übt Bdp1 eine sehr basale hochkonservierte Funktion aus, welche im Säuger System für die Transkription der genintern- wie auch der genextern regulierten Promotoren benötigt wird (s. 4.4). Vermutlich handelt es sich dabei wie in der Hefe um die Öffnung der DNA im Bereich des Transkriptionsstartpunktes (Kassavetis et al., 2001). Im Analogschluss zur Hefe wurde hBdp1 den beiden humanen TFIIIB Aktivitäten zugeordnet, wonach hTBP, hBrf1 und hBdp1 die TFIIIB $\beta$ -Aktivität der "klassischen Gene" bilden und analog dazu hTBP, hBrf2 und hBdp1 die TFIIIB $\alpha$ -Aktivität der 5'-regulierten Gene repräsentieren sollen (Schramm et al., 2000; Teichmann et al., 2000). Der wesentliche Unterschied zur Hefe liegt jedoch in der unterschiedlichen Stabilität dieser TFIIIB-Komponenten innerhalb des Promotor-assemblierten Transkriptionskomplexes. In der Hefe bilden  $\gamma$ TBP,  $\gamma$ Brf1 und  $\gamma$ Bdp1 prinzipiell einen sehr stabilen Komplex am Promotor aus, der weder durch das Polyanion Heparin noch durch hohe Salzkonzentrationen (NaCl) teilweise oder vollständig dissoziiert werden kann (Kassavetis et al., 1990, 1995). Im humanen System dagegen dissoziiert TFIIIC1/hBdp1 in Folge einer Heparinbehandlung vom vollständig assemblierten wie auch vom partiell assemblierten Transkriptionskomplex. Dies gilt sowohl für den genintern lokalisierten VAI-Promotor (Wagner, 2002) wie auch für den 5'-gelegenen U6-

Promotor (Daten nicht gezeigt). Lediglich hTBP und hBrf1 bzw. hBrf2 sind gegenüber einer Promotor-Dissoziation durch Heparin resistent (Wagner, 2002; Daten nicht gezeigt) und somit sehr stabil am jeweiligen Promotor-Typ assembliert. Diese unterschiedlichen Beobachtungen im System der Hefe und des Menschen lassen darauf schließen, dass sich Bdp1 im Verlauf der Evolution zu einem eigenständigen Transkriptionsfaktor entwickelt hat. Zudem haben sich im mehrzelligen Organismus zusätzliche Bdp1-Domänen entwickelt (die Wiederholungsmotive und der C-Terminus). Über diese Domänen könnte hBdp1 neue regulatorische Funktionen übernommen haben, welche innerhalb eines komplexeren Mehrzeller-Organismus essentiell sind, im Einzeller dagegen nicht benötigt werden. Welche der bisher beschriebenen hBdp1-Formen in verschiedenen Geweben bzw. in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus *in vivo* bevorzugt rekrutiert wird, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch offen. Die bisherigen ChIP-Untersuchungen (z.B. Schramm et al., 2000; Fairely et al., 2003) sind mit gegen den N-Terminus gerichteten Bdp1-Antikörpern durchgeführt worden und erkennen daher jede der bisher beschriebenen hBdp1-Formen.

Bisher untersuchte Metazoen-spezifische regulatorische Elemente bilden die Gruppe der Tumorsuppressorproteine (Rb, p53, p107, p130), welche unter anderem inhibitorische Effekte auf die Pol III Transkription zeigen (Larminie et al., 1997; Scott et al., 2001; Chesnokov et al., 1996; Cairns und White, 1998; Stein et al., 2002b; Suttcliffe et al., 1999). Es ist beschrieben worden, dass beispielsweise p53 mit TBP interagieren soll, wodurch die Assoziation des TBP/Brf1-Komplexes mit TFIIIC2 und der Pol III verhindert wird, was letztendlich zur Hemmung der TFIIIB $\beta$ -Rekrutierung führt (Crighton et al., 2003). Für das Onkogen Produkt c-Myc wurde postuliert, dass es durch Interaktionen mit TBP und Brf1 zur Stimulierung der Pol III Transkription an genintern regulierten Promotoren führen soll (Gomez-Roman et al., 2003).

Aufgrund der Entwicklung zusätzlicher, für die basale Transkription nicht essentiell benötigter hBdp1-Strukturen und der Beobachtung, dass neben TBP lediglich Bdp1 einen generellen Transkriptionsfaktor des humanen RNA Polymerase III Systems darstellt, ist davon auszugehen, dass hBdp1 einen Verknüpfungspunkt zwischen Regulation und basaler Transkription bildet.

## 5.7 Ausblick

Zukünftige Untersuchungen innerhalb des RNA Polymerase III Systems sollten sich der detaillierten Funktion und Regulation der verschiedenen hBdp1-Formen widmen. Neben Koimmunopräzipitationen mit den verschiedenen hBdp1-Varianten könnten Zelllinien, die jeweils eine bestimmte hBdp1-Form mit Affinitätstagg exprimieren, per Affinitätsreinigung Aufschluss über potentielle hBdp1-assoziierte Proteine geben. Somit könnte die Frage beantwortet werden, in wie weit die verschiedenen hBdp1-Varianten einen Angriffspunkt für die Genregulation bilden. Zudem stellt die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) eine Technik dar, mit welcher zu jedem beliebigen Zeitpunkt innerhalb des Zellzyklus eine Analyse in Bezug auf die Bdp1-Promotor-Okkupierung an verschiedenen Pol III Promotortypen durchgeführt werden kann. Um eine Aussage darüber treffen zu können, welche der verschiedenen hBdp1-Formen jeweils rekrutiert wird, ist die Synthese von anti Bdp1 Antikörpern erforderlich, die entweder den N-Terminus, die Wiederholungsmotive oder den C-Terminus von hBdp1 erkennen.

Unserem Labor ist es kürzlich gelungen einen induzierbaren RNA Polymerase III-abhängigen Expressionsvektor zur siRNA Expression zu entwickeln. Mit Hilfe dieses Systems könnte die Auswirkung eines reversiblen Bdp1 knock outs auf das Wachstum beispielsweise einer Tumorzelle untersucht werden.

## 6 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor TFIIIC1 wird für die RNA-Synthese aller humanen Polymerase III-abhängigen Gene unabhängig vom jeweiligen Promotortyp essentiell benötigt. Zudem übernimmt TFIIIC1 regulatorische Funktionen zum Beispiel während des Differenzierungsprozesses von F9 Embryonalen Carcinomazellen. Innerhalb des humanen Pol III Systems ist TFIIIC1 der einzige Transkriptionsfaktor dessen Untereinheiten-Zusammensetzung bisher noch immer ungeklärt blieb.

Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit lag daher in der chromatographischen Reinigung von TFIIIC1-aktiven Fraktionen. Es sollte eine TFIIIC1-Präparation entstehen, die per MALDI TOF Analyse die Untersuchung der Polypeptid-Zusammensetzung von TFIIIC1 ermöglicht.

Aufgrund der mechanischen und oxidativen Instabilität von TFIIIC1 während der Chromatographie sowie der Beobachtung, dass TFIIIC1 ein sehr selten in der Zelle vorkommender Faktor ist, war es wichtig, eine sehr große Menge an cytoplasmatischem Extrakt als Ausgangsmaterial einzusetzen. Zudem wurden sämtliche verwendete Puffer sorgfältig entgast, wodurch der Verlust an TFIIIC1 Transkriptionsaktivität erfolgreich minimiert werden konnte. Der neu eingesetzte Anionentauscher MiniQ ermöglichte neben der Reinigung auch eine Konzentrierung von TFIIIC1-aktiven Fraktionen, was für die anschließende präparative Gelfiltration essentiell war. Die Größenselektion über Gelfiltration als fünfter und zugleich letzter Schritt innerhalb der TFIIIC1 Reinigungsstrategie ermöglichte die MALDI TOF Analyse von sieben Polypeptiden, die als potentielle Untereinheiten von TFIIIC1 in Frage kamen. Die zur Auswertung dieser analysierten Polypeptide durchgeführten Western Blot Analysen sowie Immunodepletionen führten erstmalig zur Identifizierung des zentralen funktionellen Polypeptids von TFIIIC1. Dabei handelt es sich um das als "Transcription Factor-like Nuclear Regulator" bezeichnete Protein TFNR. Der N-Terminus dieses 250 kDa Proteins ist über 846 Aminosäuren mit dem 150-160 kDa Protein hBdp1 (hB'', TFIIIB150) identisch, welches als basaler Pol III Transkriptionsfaktor und Bestandteil der humanen TFIIIB Aktivitäten be-



schrieben worden ist. Mit der Identifizierung des für die TFIIIC1 Transkriptionsaktivität verantwortlichen Polypeptids ist es zugleich gelungen für die 250 kDa-Variante von hBdp1 (TFNR) eine Funktion als essentiell benötigte Pol III Transkriptionsaktivität zu zeigen.

Kleinere hBdp1-Varianten von 90 bis 150 kDa sind mit großer Sicherheit für die Transkriptionsaktivität des zu TFIIIC1 funktionell austauschbaren Faktors TFIIIC1like verantwortlich. Bei diesen hBdp1-Varianten handelt es sich höchstwahrscheinlich um die bereits beschriebenen 150-160 kDa Formen von hBdp1 (hB'' bzw. TFIIIB150). Die Austauschbarkeit der TFIIIC1 Aktivitäten mit rekombinantem hBdp1 (rTFIIIB150) in der rekonstituierten Pol III Transkription zeigt, dass *in vitro* der N-Terminus von hBdp1 für eine effiziente Pol III Transkriptionsaktivität ausreichend ist.

Die Inaktivierung von F9-Zellextrakten nach der Differenzierung zu F9 Parietalen Endodermzellen (F9 PE) ist auf die Inaktivierung von TFIIIC1 und dem gleichzeitigen Fehlen von TFNR zurückzuführen. Durch Zugabe von rekombinantem Bdp1 (rTFIIIB150) bzw. den verschiedenen TFIIIC1 Aktivitäten können die Pol III-transkriptionsinaktiven F9 PE-Extrakte reaktiviert werden, während TBP und Brf1 keinen Effekt zeigen.

Im Gegensatz zur Hefe bildet humanes Bdp1 keinen stabilen Komplex mit den TFIIIB-Komponenten hTBP und hBrf1 bzw. hBrf2 innerhalb des Promotor-assemblierten Transkriptionskomplexes. Bdp1 hat sich also im Verlauf der Evolution zu einem eigenständigen Transkriptionsfaktor entwickelt. Zudem liegt die 250 kDa Form von hBdp1 (TFNR) mit großer Wahrscheinlichkeit mit anderen Proteinen assoziiert vor. Einen weiteren Unterschied zum Einzeller-System bildet die Existenz verschiedener hBdp1-Formen, welche möglicherweise Zelltyp-spezifische *in vivo* Funktionen ausüben. So haben sich neben dem konservierten N-Terminus zusätzliche hBdp1-Domänen entwickelt (Wiederholungsmotive und der C-Terminus). Diese Strukturen könnten im Verlauf der Evolution neue regulatorische Funktionen übernommen haben, welche innerhalb eines komplexen Mehrzeller-Organismus essentiell für die Gewebe-spezifische Regulation der Genexpression sind.

## 7 Abkürzungen

<b>A</b>	Adenin
<b>AA</b>	Acrylamid
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>A.bid.</b>	Aqua bidest
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BA</b>	N,N-Methylenbisacrylamid
<b>Bp</b>	Basenpaar
<b>BSA</b>	"Bovine Serum Albumin" (Rinderserumalbumin)
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>C</b>	Cytosin
<b>cDNA</b>	„copy“ DNA
<b>Ci</b>	Curie
<b>cpm</b>	"counts per minute" (Impulse pro Minute)
<b>CTP</b>	Cytidintriphosphat
<b>DEAE</b>	Diethylaminoethan
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure ("acid")
<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease
<b>dNTP</b>	Desoxynukleosidtriphosphat
<b>DSE</b>	Distales Sequenzelement
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EBER-RNA</b>	Epstein-Barr-Virus assoziierte RNA
<b>ECL</b>	"Enhance Chemolumineszenz"
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Eschericia coli</i>
<b>EDF</b>	EMD-DEAE Fractogel 650S
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EGTA</b>	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraacetat
<b>EMSA</b>	"Electrophoretic mobility shift assay"
<b>et al.</b>	„et aliter“ (und andere)
<b>Fc</b>	"Fragment crystallizable" (Immunglobulin-Fragment)
<b>FKS</b>	Fötales Kälberserum
<b>FPLC</b>	"Fast Performance Liquid Chromatography"
<b>G</b>	Guanin
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>h</b>	human
<b>HEK</b>	"human embryonic kidney"
<b>HeLa</b>	Zelllinie eines humanen Cervix-Karzinoms
<b>Hepes</b>	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
<b>hnRNA</b>	heterogen nukleäre RNA
<b>ICR</b>	"internal control region"
<b>IE</b>	"intermediate element"
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IPTG</b>	Isopropyl-thio-β-galactosid
<b>kB</b>	Kilobasen
<b>kDa</b>	Kilo-Dalton (Masseneinheit)

## Abkürzungen

---

<b>KE</b>	Kernextrakt
<b>LB-Medium</b>	Luria-Bertoni-Medium
<b>Lsg.</b>	Lösung
<b>M</b>	molar
<b>mA</b>	Milliampere
<b>mg / µg</b>	Milligramm / Mikrogramm
<b>ml / µl</b>	Milliliter / Mikroliter
<b>min.</b>	Minute
<b>MQ / MS</b>	Mono Q / MonoS
<b>mRNA</b>	Boten-RNA ("messenger" RNA)
<b>ng</b>	Nannogramm
<b>NTP</b>	Nukleosidtriphosphat
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBP</b>	PSE-bindendes Protein
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphate-buffered-saline“)
<b>PC</b>	Phosphocellulose
<b>PCI</b>	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch
<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
<b>PCV</b>	"packed cell volume"
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>Pol I, II und III</b>	RNA Polymerase I, II, und III
<b>Poly-(dAdT)</b>	Poly-(desoxyadenosin-desoxthymidin)
<b>Poly-(dIdC)</b>	Poly-( desoxyinosin-desoxcytidin)
<b>pH</b>	Wasserstoffexponent (neg. dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
<b>PSE</b>	Proximales Sequenzelement
<b>pUC</b>	Plasmid of University of California
<b>QS</b>	Q Sepharose
<b>r</b>	rekombinant
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>RNP</b>	„Ribonucleoprotein Particle“
<b>RPC</b>	RNA Polymerase C (III) (Untereinheit der Pol III)
<b>rRNA</b>	ribosomale RNA
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s.</b>	siehe
<b>S</b>	Svedberg-Einheit (Sedimentationskoeffizient)
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe)
<b>SDS</b>	Natrium- ("sodium-") Dodecylsulfat
<b>SEC</b>	Size Exclusion Chromatography
<b>sek.</b>	Sekunde
<b>SNAPc</b>	"snRNA-activating protein complex"
<b>snRNA</b>	"small nuclear" RNA
<b>Sp</b>	"stimulating protein" (stimulierendes Protein)
<b>SV</b>	Säulenvolumen
<b>S100</b>	Zytoplasmatischer Extrakt

## Abkürzungen

---

<b>T</b>	Thymin
<b>TAF</b>	TBP assoziierter Faktor
<b>TBA</b>	Terminationsregion bindende Aktivität
<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA-Puffer
<b>TBP</b>	TATA-Box-bindendes Protein
<b>TCA</b>	Trichloressigsäure
<b>TE</b>	Tris-EDTA-Puffer
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<b>TFI, II, und III</b>	Transkriptionsfaktor der RNA-Polymerase I, II und III
<b>TM</b>	„Trademark“
<b>Tris</b>	Tris-hydroxy-ethyl-aminomethan
<b>tRNA</b>	„transfer“ RNA
<b>Tween</b>	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
<b>U</b>	Unit (Einheit der jeweiligen Enzymaktivität)
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>UpM</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>UTP</b>	Uridintriphosphat
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>v/v</b>	Volumen/Volumen ("volume per volume")
<b>V</b>	Volt (Maß für elektrische Spannung)
<b>Vol.</b>	Volumen
<b>VA RNA</b>	virus-assoziierte RNA (hier: ausschließlich VA1 RNA des Adenovirus)
<b>VT</b>	Volumenteile
<b>W</b>	Watt
<b>w/v</b>	Gewicht/Volumen ("weight per volume")
<b>X-Gal</b>	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-_-D-Galaktosid
<b>X.l.</b>	<i>Xenopus laevis</i>
<b>y</b>	"yeast" (Hefe)
<b>z. B.</b>	zum Beispiel
<b>°C</b>	Grad Celsius

## 8 Literaturverzeichnis

**Aasland, R., Stewart, A.F. und Gibson, T. (1996).** The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 87-88

**Abarazua, P. und Sherman, M. (1990).** Differentiation of embryonal carcinoma cells in response to Retinoids. *Meth. Enzymol.*, **189**, 337-348

**Alzuherri, H.M. und White, R.J. (1998).** Regulation of a TATA-binding protein-associated factor during cellular differentiation. *J. Biol. Chem.*, **27**, 17166-17171

**Arakawa, H., Nagase, H., Hayashi, N., Ogawa, M., Nagata, M., Fujiwara, T., Takahashi, E., Shin, S. und Nakamura, Y. (1995).** Molecular cloning, characterisation and chromosomal mapping of a novel human gene (GTF3A) that is highly homologous to *Xenopus* transcription factor IIIA. *Cytogenet. Cell Genet.*, **70**, 235-238

**Armstrong, J.A. und Emerson, B.M. (1998).** Transcription of chromatin: these are complex times. *Cur. Opin. Gen. Dev.*, **8**, 165-172

**Arrebola, R., Manaud, N., Rozenfeld, S., Marsolier, M.C., Lefebvre, O., Carles, C., Thuriaux, P., Conesa, C. und Sentenac, A. (1998).**  $\tau$ 91, an essential subunit of yeast transcription factor IIIC cooperates with  $\tau$ 138 in DNA binding. *Mol Cell Biol.*, **18**, 1-9

**Baer, M., Nielsen, T.W., Costigan, C. und Altmann, S. (1989).** Structure of a human gene for H1 RNA, the RNA component of human RNase P. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 97-103

**Bai, L., Wang, Z., Yoon, J.B. und Roeder, R.G. (1996).** Cloning and characterization of the  $\beta$  subunit of human proximal sequence element-binding transcription factor and its involvement in transcription of small nuclear RNA genes by RNA polymerase II and III. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 5419-5426

**Baker, R.E., Camier, S., Sentenac, A. und Hall, B.D. (1987).** Gene size differentially affects the binding of yeast transcription factor  $\tau$  to two intragenic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8768-8772

**Bartholomew, B., Kassavetis, G.A., Braun, B.R. und Geiduschek, E.P. (1990).** The subunit structure of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor IIIC probed with a novel photocrosslinking reagent. *Embo J.*, **9**, 2197-2205

**Bartholomew, B., Kassavetis, G.A. und Geiduschek, E.P. (1991).** Two components of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor IIIB (TFIIIB) are stereospecifically located upstream of a tRNA gene and interact with the second-largest subunit of TFIIIC. *Mol. Cell Biol.*, **11**, 5181-5189

**Bieker, J.J., Martin, P.L. und Roeder, R.G. (1985).** Formation of a rate-limiting intermediate in 5S RNA gene transcription. *Cell*, **40**, 119-127

**Blum, H., Beier, H. und Gross, H. (1987).** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99

**Bobkova, E.V. und Hall, B.D. (1997).** Substrate specificity of the RNase activity of yeast RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22832-22839

- Bogenhagen, D.F., Sakonju, S. und Brown, D.D. (1980).** A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: II. The 3' border of the region. *Cell*, **19**, 27-35
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254
- Brethnach R. und Chambon, P. (1981).** Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 349-383
- Brun, I., Sentenac, A. und Werner, M. (1997).** Dual role of the C34 subunit of RNA polymerase III in transcription initiation. *EMBO J.*, **16**, 5730-5741
- Buratowski, S. und Zhou, H. (1992).** A suppressor of TBP mutations encodes an RNA polymerase III transcription factor with homology to TFIIIB. *Cell*, **71**, 221-230
- Buratowski, S. (1994).** The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* **77**, 1-3.
- Burnol, A.F., Margottin, F., Almouzni, G., Prioleau, M.N., Mechali, M. und Sentenac, A. (1993a).** TFIIIC relieves repression of U6 snRNA transcription by chromatin. *Nature*, **362**, 475-477
- Burnol, A.F., Margottin, F., Schultz, P., Marsolier, M.C., Oudet, P. und Sentenac, A. (1993b).** Basal promoter and enhancer element of yeast u& snRNA gene. *J. Mol. Biol.*, **233**, 644-658
- Cabart, P., und Murphy, S. (2001).** BRFU, a TFIIIB-like factor, is directly recruited to the TATA-box of polymerase III small nuclear RNA gene promoters through its interaction with TATA-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **276**, 43056-43064
- Cabart, P., und Murphy, S. (2002).** Assembly of human small nuclear RNA gene-specific transcription factor IIIB complex *de Novo* on and off promoter. *J. Biol. Chem.*, **277**, 26831-26838
- Cairns, C.A. und White, R.F. (1998).** p53 is a general repressor of RNA polymerase III transcription. *EMBO*, **17**, 3112-3123
- Campbell, F.E., und Setzer, D.R. (1992).** Transcription termination by RNA polymerase III: uncoupling of polymerase release from termination signal recognition. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 2260-2272
- Cannon, R.E., Wu, G.J. und Railey, J.F. (1986).** Functions of and interactions between the A and B blocks in adenovirus type 2-specific VARNA1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1285-1289
- Chambon, P. (1975).** Eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 613-638
- Chargaff, E. (1955)** Isolation and composition of the desoxypentose nucleic acid and the corresponding nuclear proteins. *Nucl. Acids Res.*, **1**, 307-407
- Chaussivert, N., Conesa, C., Shaaban, S. und Sentenac, A. (1995).** Complex interactions between yeast TFIIIB and TFIIIC. *J. Biol. Chem.*, **270**, 15353-15358
- Chédin, S., Riva, M., Schultz, P., Sentenac, A. & Carles, C. (1998a).** The RNA cleavage activity of RNA polymerase III is mediated by an essential TFIIIS-like subunit and is important for transcription termination. *Genes Dev.*, **12**, 3857-3871
- Chédin, S. Ferri, M.L., Peyroche, G., Andrau, J.C., Jourdain, S. und Lefèbvre, O. (1998b).** The yeast transcription machinery: a paradigm for eucaryotic gene activation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **63**, 381-389

- Chesnokov, I., Chu, W.M., Botchan, M.R. und Schmid, C.W. (1996).** P53 inhibits RNA polymerase III-directed transcription in a promoter-dependent manner. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 7084-7088
- Chiang, C.M., Ge, H., Wang, Z., Hoffmann, A. und Roeder, R.G. (1993).** Unique TATA-binding protein-containing complexes and cofactors involved in transcription by RNA polymerases II and III. *EMBO J.*, **12**, 2749-2762
- Chu, W.M., Wang, Z., Roeder, R.G. und Schmid, C.W. (1997).** RNA polymerase III transcription repressed by RB through its interactions with TFIIB und TFIIC2. *J. Biol. Chem.*, **272**, 14755-14761
- Ciliberto, G., Raugei, G., Costanzo, F., Dente, L. und Cortese, R. (1983).** Common and interchangeable elements in the promoters of genes transcribed by RNA polymerase III. *Cell*, **32**, 725-733
- Clemens, K.R., Liao, X., Wolf, V., Wright, P.E. und Gottesfeld, J.M. (1992).** Definition of the binding sites of individual zinc fingers in the transcription factor IIIA-5S RNA gene complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10822-10826
- Colbert, T. und Hahn, S. (1992).** A yeast TFIIB-related factor involved in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev.*, **6**, 1940-1949
- Colbert, T., Lee, S., Schimmack, G. und Hahn, S. (1998).** Architecture of protein and DNA contacts within the TFIIB-DNA complex. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 1682-1691
- Comai, L., Tanese, N. & Tijan, R. (1992).** The TATA-binding and associated factors are integral components of RNA polymerase I transcription factor SL1. *Cell.*, **68**, 161-190
- Conaway, R.C. und Conaway, J.W. (1993).** General initiation factors of RNA polymerase II. *Ann. Rev. Biochem.*, **65**, 161-190
- Conesa, C., Swanson, R.N., Schultz, P., Oudet, P. und Sentenac, A. (1993).** On the subunit composition, stoichiometry and phosphorylation of the yeast transcription factor TFIIC/ $\tau$ . *J. Biol. Chem.*, **268**, 18047-18052
- Cormach, B.P. und Struhl, K. (1992).** The TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells. *Cell*, **69**, 685-696
- Courey, A.J. und Tijan, R. (1988).** Analysis of Sp1 *in vivo* reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine rich activation motif. *Cell*, **55**, 887-898
- Crichton, D., Woiwode, A., Zhang, C., Mandavia, N., Morton, J.P., Warnock, L.J., Milner, J., White, R.J. und Johnson, D.L. (2003).** p53 represses RNA polymerase III transcription by targeting TBP and inhibiting promoter occupancy by TFIIB. *EMBO J.*, **22**, 2810-2820
- Dagert, M., Ehrlich, S.D. (1979).** Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene.*, **6**, 23-8
- Danzeiser, D.A., Urso, O. und Kunkel, G.R. (1993).** Functional characterisation of elements in a human U6 small nuclear RNA gene distal control region. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4670-4678
- Darrow, A.L., Rickles, R.J. und Strickland, S. (1990).** Maintenance and use of F9 Teratocarcinoma cells. *Meth. Enzymol.*, **190**, 110-117
- Dean, N. und Berk, A.J. (1987).** Separation of TFIIC into two functional components by sequence specific DNA affinity chromatography. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 9895-9907

- Dean, N. und Berk, A.J. (1988).** Ordering promoter binding of class III transcription factors TFIIIC1 and TFIIIC2. *Mol. Cell Biol.*, **8**, 3017-3025
- Dieci, G., Duimio, L., Coda-Zabetta, F., Sprague, K.U. und Ottonello, S. (1993).** A novel RNA polymerase III transcription factor fraction that is not required for template commitment. *J. Biol. Chem.*, **268**, 11199-11207
- Dieci, G., Hermann-Le Denmat, S., Lukhtanov, E., Thuriaux, P., Werner, M. & Sentenac, A. (1995).** A universally conserved region of the largest subunit participates in the active site of RNA polymerase III. *EMBO J.*, **14**, 3766-3776
- Dieci, G. und Sentenac, A. (1996).** Facilitated recycling pathway for RNA polymerase III. *Cell*, **84**, 245-252
- Drew, P.D., Nagle, J.W., Canning, R.D., Ozato, K., Biddison, W.E. und Becker, K.G. (1995).** Cloning and expression analysis of a human cDNA homologous to *Xenopus* TFIIIA. *Gene*, **159**, 215-218
- Dumay, H., Rubbi, L., Sentenac, A. und Marck, C. (1999).** Interaction between yeast RNA polymerase III and transcription factor TFIIIC via ABC10 alpha and tau 131 subunits. *J. Biol. Chem.*, **274**, 33462-33468
- Engelke, D.R., Ng, S.Y., Shastry, B.S. und Roeder, R.G. (1980).** Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S genes. *Cell*, **19**, 717-728
- Fabrizio, P., Coppo, A., Fruscoloni, P., Benedetti, P., Di Segni, G. und Tocchini-Valentini, G.P. (1987).** Comparative mutational analysis of wild-type and stretched tRNA<sub>3</sub><sup>Leu</sup> gene promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8763-8767
- Fairley, J.A., Scott, P.H. und White, R.J. (2003).** TFIIIB is phosphorylated, disrupted and selectively released from tRNA promoters during mitosis *in vivo*. *EMBO J.*, **21**, 5841-5850
- Felton-Edkins, Z.A., Fairley, J.A., Graham, E.L., Johnston, I.M., White, R.J. und Scott, P.H. (2003).** The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIIB. *EMBO J.*, **22**, 2422-2432
- Ferri, M.L., Peyroche, G., Siaut, M., Lefebvre, O., Carles, C., Conesa, C. und Sentenac, A. (2000).** A novel subunit of yeast RNA polymerase III interacts with the TFIIIB-related domain of TFIIIB70. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 488-495
- Flores, A., Briand, J.F., Gadal, O., Andrau, J.C., Rubbi, L., Van Mullem, V., Boschiero, C., Goussot, M., Marck, C., Carles, C., Thuriaux, P., Sentenac, A. und Werner, M. (1999).** A protein-protein interaction map of yeast RNA polymerase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7815-7820
- Ford, E., Sturbin, M. und Hernandez, N. (1998).** The Oct-1 POU domain activates snRNA gene transcription by contacting a region in the SNAPc largest subunit that bears sequence similarities with the Oct-1 coactivator OBF-1. *Genes Dev.*, **12**, 3528-3540
- Foster, M.P., Wuttke, D.S., Radhakrishnan, I., Case, D.A., Gottesfeld, J.M. und Wright, P.E. (1997).** Domain packing and dynamics in the DNA complex of N-terminal zinc fingers of TFIIIA. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 605-608
- Fowlkes, D.M. und Schenk, T. (1980).** Transcriptional control regions of the adenovirus VAI RNA gene. *Cell*, **22**, 405-413
- Fradkin, L.G., Yoshinaga, S.K., Berk, A.J. und Dasgupta, A. (1989).** Human transcription factor TFIIIC2 specifically interacts with a unique sequence in the *Xenopus laevis* 5S rRNA gene. *Mol. Cell Biol.*, **9**, 4941-4950



- Gabrielson, O.S., Marzouki, N., Ruet, A., Sentenac, A. und Fromageot, P. (1989).** Two polypeptide chains in yeast transcription factor  $\tau$  interact with DNA. *J. Biol. Chem.*, **264**, 7505-7511
- Gabrielsen, O.S. und Sentenac, A. (1991).** RNA polymerase III (C) and its transcription factors. *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 412-416
- Geiduschek, E.P. und Kassavetis, G.A. (1992).** RNA polymerase III transcription complexes. In: Transcriptional Regulation (Hrsg. S.L. McKnight und K.R. Yamamoto), 247-280, *Cold Spring Harbor Press, New York*
- Geiduschek, E.P. und Kassavetis, G.A. (2001).** The RNA Polymerase III Transcription Apparatus. *J. Mol. Biol.*, **310**, 1-26
- Geiduschek, E.P. und Tocchini-Valentini, G.P. (1988).** Transcription by RNA polymerase III. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 873-914
- Ghavidel, A. und Schultz, M.C. (1997).** Casein kinase II regulation of yeast TFIIIB is mediated by the TATA-binding protein. *Genes Dev.*, **11**, 2780-2789
- Ghavidel, A., Hockman, D.J. und Schultz, M.C. (1999).** A review of progress towards elucidating the role of protein kinase CK2 in polymerase III transcription: regulation of TATA binding protein. *Mol. Cell Biochem.*, **191**, 143-148
- Gillesen, S., Groettrup, M. und Cerny, T. (2002).** The Proteasome, a New Target for Cancer Therapy. *Onkologie*, **25**, 534-539
- Ginsberg, A.M., King, B.O. und Roeder, R.G. (1984).** *Xenopus* 5S gene transcription factor, TFIIIA: characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. *Cell*, **39**, 479-489
- Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R.N. und White, R.J. (2003).** Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature*, **421**, 290-294
- Greasley, P.J., Bonnard, C. und Amati, B. (2000).** Myc induces the nucleolin and BN51 genes: possible implications in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 446-453
- Gruber, C. (2000).** Untersuchungen zur Funktion und Zusammensetzung der humanen Pol III-Transkriptionsfaktoren TFIIIB $\alpha$  und TFIIIU. In *Fachbereich Humanmedizin*. Marburg: Philipps-Universität
- Grummt, I. (1981).** Specific transcription of mouse ribosomal DNA in a cell-free system that mimics control in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 727-731
- Guenther, M.G., Barak, O. und Lazar, M.A. (2001).** The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 6091-6101
- Guilfoyle, R. und Weinmann, R. (1981).** Control region for adenovirus VA RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3378-3382
- Hafner, H.M. (2002).** Reinigung des Transkriptionsfaktors IIIC1 der RNA-Polymerase III und Identifizierung potentieller TFIIIC1-Untereinheiten. In *Fachbereich Humanmedizin*. Marburg: Philipps-Universität
- Harismendy, O., Gendrel, C.G., Soularue, P., Gidrol, X., Sentenac, A., Werner, M. und Lefebvre, O. (2003).** Genome-wide location of yeast RNA polymerase III transcription machinery. *EMBO J.*, **18**, 4738-4747

- Härtel, F. (1999).** Untersuchungen zur Regulation RNA-Polymerase III transkribierter Gene während der G0-Phase des Zellzyklus. In *Fachbereich Humanmedizin*. Marburg: Philipps-Universität
- Henry, R.W., Sadowski, C.L., Kobayashi, R. und Hernandez, N. (1995).** A TBP-TAF complex required for transcription of human snRNA genes by RNA polymerases II and III. *Nature*, **374**, 653-656
- Henry, R.W., Ma, B., Sadowski, C.L., Kobayashi, R. und Hernandez, N. (1996).** Cloning and characterization of SNAP50, a subunit of the snRNA-activating protein complex SNAPc. *EMBO J.*, **15**, 7129-7136
- Henry, R.W., Ford, E., Mital, R., Mittal, V. und Hernandez, N. (1998a).** Crossing the line between RNA polymerases: Transcription of human snRNA genes by RNA polymerases II and III. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **63**, 111-120
- Henry, R.W., Mittal, V., Ma, B., Kobayashi, R. und Hernandez, N. (1998b).** Assembly of a functional core promoter complex (SNAPc) shared by RNA polymerase II and III. *Genes Dev.*, **12**, 2664-2672
- Hernandez, N. (1992).** Transcription of vertebrate snRNA genes and related genes. In *Transcriptional Regulation*, 281-314. Edited by S.L. McKnight & M. Yamamoto. New York: Cold Spring Harbor Press.
- Hernandez, N. (1993).** TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev.*, **7**, 1291-1308
- Hernandez, N. (2001).** Small Nuclear RNA Genes: a Model System to Study Fundamental Mechanisms of Transcription. *J. Biol. Chem.*, **29**, 26733-26736
- Herr, W., Sturm, R.A., Clerc, R.G., Corcoran, L.M., Baltimore, D., Sharp, P.A., Ingraham, H.A., Rosenfeld, M.G., Finney, M., Ruvkun, G. und Horvitz, H.R. (1988).** The POU domain: A large conserved region in the mammalian *pit-1*, *oct-1*, *oct-2* and *Caenorhabditis elegans unc-86* gene products. *Genes Dev.*, **2**, 1513-1516
- Hirsch, H.A., Gu, L. und Henry, R.W. (2000).** The retinoblastoma tumor suppressor protein targets distinct general transcription factors to regulate RNA polymerase III gene expression. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 9182-9191
- Hisatake, K., Roeder, R.G. und Horikoshi, M. (1993).** Functional dissection of TFIIB domains required for TFIIB-TFIID-promoter complex formation and basal transcription activity. *Nature*, **363**, 744-777
- Hofstetter, H., Kressman, A. und Birnstiel, M.L. (1981).** A split promoter for a eucaryotic tRNA gene. *Cell*, **24**, 573-585
- Horikoshi, M., Bertuccioli, C., Takada, R., Wang, J., Yamamoto, T. und Roeder, R.G. (1992).** Transcription factor TFIID induces DNA bending upon binding to the TATA element. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 1060-1064
- Hsieh, Y.J., Wang, Z., Kovelman, R. und Roeder, R.G. (1999a).** Cloning and characterization of two evolutionarily conserved subunits (TFIIIC102 and TFIIIC63) of human TFIIIC and their involvement in functional interactions with TFIIB and RNA polymerase III. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 4944-4952
- Hsieh, Y.J., Kundu, T.K., Wang, Z., Kovelman, R. und Roeder, R.G. (1999b).** The TFIIIC90 subunit of TFIIIC interacts with multiple components of the RNA polymerase III machinery and contains a histone-specific acetyltransferase activity. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 7697-7704

- Hu, P., Wu, S. und Hernandee, N. (2003).** A minimal RNA polymerase III transcription system from human cells reveals positive and negative regulatory roles for CK2. *Mol. Cell*, **12**, 699-709
- Huang, Y. und Maraia, R.J. (2001).** Comparison of the RNA polymerase III transcription machinery in *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and human. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2675-2690
- Huet, J. und Sentenac, A. (1992).** The TATA-binding protein participates in TFIIIB assembly on tRNA genes. *Nucleic. Acids Res.*, **20**, 6451-6454
- Huet, J., Conesa, C., Manaud, N., Chaussivert, N. und Sentenac, A. (1994).** Interactions between yeast TFIIIB components. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 2282-2288
- Ittmann, M., Greco, A. und Basilico, C. (1987).** Isolation of the human gene that complements a temperature-sensitive cell cycle mutation in BHK cells. *Mol. Cell Biol.*, **7**, 3386-3393
- Ittmann M, Ali J, Greco A. und Basilico C. (1993)** The gene complementing a temperature-sensitive cell cycle mutant of BHK cells is the human homologue of the yeast RPC53 gene, which encodes a subunit of RNA polymerase C (III). *Cell Growth Differ.*, **4**, 503-11
- Ittmann, M.M., (1994).** Cell cycle control of the BN51 cell cycle gene which encodes a subunit of RNA polymerase III. *Cell Growth Differ.*, **5**, 783-788
- Joazeiro, C.A., Kassavetis, G.A. und Geiduschek, E.P. (1994).** Identical components of yeast transcription factor IIIB are required and sufficient for transcription of TATA box-containing and TATA-less genes. *Mol. Cel. Biol.*, **14**, 2798-2808
- Joazeiro, C.A., Kassavetis, G.A. und Geiduschek, E.P. (1996).** Alternative outcomes in assembly of promoter complexes: the roles of TBP and a flexible linker in placing TFIIIB on tRNA genes. *Genes Dev.*, **10**, 725-739
- Johnston, I.M., Allison, S.J., Morton, J.P., Schramm, L., Scott, P.H. und White, R.J. (2002).** CK2 forms a stable complex with TFIIIB and activates RNA polymerase III transcription in human cells. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 3757-3768.
- Juo, Z.S., Chiu, T.K., Leibermann, P.M., Baikarov, I., Berk, A.J. und Dickerson, R.E. (1996).** How proteins recognize the TATA box. *J. Mol. Biol.*, **261**, 239-254
- Kassavetis, G.A., Riggs, D.L., Negri, R., Nguyen, L.H. und Geiduschek, E.P. (1989).** Transcription factor IIIB generates extended DNA interactions in RNA polymerase III transcription complexes on tRNA genes. *Mol Cell Biol*, **9**, 2551-2566
- Kassavetis, G.A., Braun, B.R., Nguyen, L.H. und Geiduschek, E.P. (1990).** *S. cerevisiae* TFIIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIIA and TFIIIC are assembly factors. *Cell*, **60**, 235-245
- Kassavetis, G.A., Bartholomew, B., Blanco, J.A., Johnson, T.E. und Geiduschek, E.P. (1991).** Two essential components of the *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor TFIIIB: transcription and DNA-binding properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7308-7312
- Kassavetis, G.A., Blanco, J.A., Johnson, T.E. und Geiduschek, E.P. (1992a).** Formation of open and elongating transcription complexes by RNA polymerase III. *J. Mol. Biol.*, **226**, 47-58
- Kassavetis, G.A., Joazeiro, C.A., Pisano, M., Geiduschek, E P., Colbert, T., Hahn, S. und Blanco, J A. (1992b).** The role of the TATA-binding protein in the assembly and function of the multisubunit yeast RNA polymerase III transcription factor, TFIIIB. *Cell*, **71**, 1055-1064

- Kassavetis, G.A., Nguyen, S.T., Kobayashi, R., Kumar, A., Geiduschek, E.P. und Pisano, M. (1995).** Cloning, expression, and function of TFC5, the gene encoding the B" component of the *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III transcription factor TFIIIB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9786-9790
- Kassavetis, G.A., Garth, A.L. und Geiduschek, E.P. (2001).** The RNA polymerase III transcription initiation factor TFIIIB participates in two steps of promoter opening. *EMBO J.*, **11**, 2823-2834
- Kelter, A.R., Herchenbach, J. und Wirth, B. (2000).** The Transcription Factor-like Nuclear Regulator (TFNR) contains a novel 55-amino-acid motif repeated nine times and maps closely to SMN1. *Genomics*, **70**, 315-326
- Khoo, B., Brophy, B. und Jackson, S.P. (1994).** Conserved functional domains of the RNA polymerase III general transcription factor BRF. *Genes Dev.*, **8**, 2879-2890
- Kim, J.L., Nikolov, D.B. und Burley, S.K. (1993a).** Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature*, **365**, 520-527
- Kim, Y., Geiger, J.H., Hahn, S. und Sigler, P.B. (1993b).** Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature*, **365**, 512-520
- Kim, S.J., Na, J.G., Hampsey, M. und Reinberg, D. (1997).** The Dr1/DRAP1 heterodimer is a global repressor of transcription *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 820-825
- Klekamp, M.S. und Weil, P.A. (1987).** Properties of yeast class III gene transcription factor TFIIIB. *J. Biol. Chem.*, **262**, 7878-7889
- Knippers, R. (1997).** Molekulare Genetik. *Georg Thieme Verlag*
- Kober, I., Teichmann, M. und Seifart, K.H. (1998).** hTFIIIB-beta stably binds to pol II promoters and recruits RNA polymerase III in a hTFIIIC1 dependent way. *J. Mol. Biol.*, **284**, 7-20
- Kovelman, R. und Roeder, R.G. (1990).** Sarkosyl defines three intermediate steps in transcription initiation by RNA polymerase III: application to stimulation of transcription by E1A. *Genes Dev.*, **4**, 646-658
- Kovelman, R. & Roeder, R. G. (1992).** Purification and characterization of two forms of human transcription factor IIIC. *J. Biol. Chem.*, **267**, 24446-24456
- Kristie, T.M., Pomerantz, J.L., Twomey, T.C., Parent, S.A. und Sharp, P.A. (1995).** The cellular C1 factor of the herpes simplex virus enhancer complex is a family of polypeptides. *J. Biol. Chem.*, **9**, 4387-4394
- Kundu, T.K., Wang, Z.X. und Roeder, R.G. (1999).** Human TFIIIC relieves chromatin-mediated repression of RNA polymerase III transcription and contains an intrinsic histone acetyltransferase activity. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 1605-1615
- Kunkel, G.R., Master, R.L., Calvet, J.P. und Pederson, T. (1986).** U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8575-8579
- Kunkel, G. R. (1991).** RNA polymerase III transcription of genes that lack internal control regions. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1088**, 1-9
- Kunkel, G.R., Cheung, T.C., Miyake, J.H., Urso, O., McNamara-Schroeder, K.J. und Stumph, W.E. (1996).** Identification of a SPH element in the distal region of a human U6 small nuclear RNA gene promoter and characterisation of the SPH binding factor in HeLa cell extracts. *Gene Expr.*, **6**, 59-72

- Kyhse-Andersen, J. (1984).** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **10**, 203-209
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685
- Lagna, G., Kovelman, R., Sukegawa, J. und Roeder, R.G. (1994).** Cloning and characterization of an evolutionarily divergent DNA-binding subunit of mammalian TFIIC. *Mol. Cell Biol.*, **14**, 3053-3064
- Larminie, C.G., Cairns, C.A., Mital, R., Martin, K., Kouzarides, T., Jackson, S.P. und White, R.J. (1997).** Mechanistic analysis of RNA polymerase III regulation by the retinoblastoma protein. *EMBO J.*, **16**, 2061-2071
- Lassar, A.B., Martin, P.L. und Roeder, R.G. (1983).** Transcription of class III genes: formation of preinitiation complexes. *Science*, **222**, 740-748
- Lee, D.K., Horikoshi, M. und Roeder, R.G. (1991).** Interaction of TFIID in the minor groove of the TATA element. *Cell*, **67**, 1241-1250
- Lefebvre, O., Carles, C., Conesa, C., Swanson, R.N., Bouet, F., Riva, M. und Sentenac, A. (1992).** TFC3: gene encoding the B-block binding subunit of the yeast transcription factor IIIC. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 10512-10516
- L'Etoile, N.D., Fahnenstock, M.L., Shen, Y., Aebershold, R. und Berk, A.J. (1994).** Human transcription factor IIIC box B binding subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1652-1656
- Lobo, S.M. und Hernandez, N. (1989).** A 7 bp mutation converts a human RNA polymerase II snRNA-promoter into an RNA polymerase III promoter. *Cell*, **58**, 55-67
- Lobo, S.M., Tanaka, M., Sullivan, M.L. und Hernandez, N. (1992).** A TBP complex for transcription of TATA-less but not TATA-containing RNA polymerase III promoters is part of the TFIIB fraction. *Cell*, **71**, 1029-1040
- López-De-León, A., Librizzi, M., Puglia, K. und Willis, I.M. (1992).** PCF4 encodes an RNA polymerase III transcription factor with homology to TFIIB. *Cell*, **71**, 211-220
- Luciano, R.L. und Wilson, A.C. (2002).** An activation domain in the C-terminal subunit of HCF-1 is important for transactivation by VP16 and LZIP. *PNAS*, **21**, 13403-13408
- Ludwig, K.W., Lowey, B. und Niles, R.M. (1980).** Retinoic Acid increases cyclic AMP-dependent protein kinase activity in murine Melanoma cells. *J. Biol. Chem.*, **255**, 5999-6002
- Ma, B. und Hernandez, N. (2002).** Redundant cooperative interactions for assembly of a human U6 transcription initiation complex. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 8067-8078
- Manaud, N., Arrebola, R., Buffin-Meyer, B., Lefebvre, O., Voss, H., Riva, M., Conesa, C. und Sentenac, A. (1998).** A chimeric subunit of yeast transcription factor IIIC forms a subcomplex with  $\tau 95$ . *Mol. Cell Biol.*, **18**, 3191-3200
- Mann, C., Micouin, J.Y., Chiannikulchai, N., Treich, I., Buhler, J.M. und Sentenac, A. (1992).** RPC53 encodes a subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase C (III) whose inactivation leads to a predominantly G1 arrest. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 4314-4326
- Maraia, R.J., Chang, D.Y., Wolffe, A.P., Vorce, R.L. und Hsu, K. (1992).** The RNA polymerase III terminator used by BR1-Alu element can modulate 3' processing of the intermediate RNA product. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1500-1506

- Marck, C., Lefebvre, O., Carles, C., Riva, M., Chaussievert, N., Ruet, A. und Sentenac, A. (1993).** The TFIIIB-assembling subunit of yeast transcription factor TFIIIC has both tetratricopeptide repeats and basic helix-loop-helix motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4027-4031
- Marzouki, N., Camier, S., Ruet, A., Moenne, A. und Sentenac, A. (1986).** Selective proteolysis defines two DNA binding domains in yeast transcription factor tau. *Nature*, **323**, 176-178
- Matsuzaki, H., Kassavetis, G.A. und Geiduschek, E.P. (1994).** Analysis of RNA chain elongation and termination by *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III. *J. Mol. Biol.*, **235**, 1173-1192
- Mattaj, I.W., Dathan, N.A., Parry, H.D., Carbon, P. und Krol, A. (1988).** Changing the RNA polymerase specificity of u snRNA gene promoters. *Cell*, **55**, 435-442
- Meißner, W., Wanandi, I., Corbon, P., Krol, A. und Seifart, K.H. (1994).** Transcription factors required for the expression of *Xenopus laevis* selenocysteine tRNA *in vitro*. *Nucl. Acid Res.*, **22**, 553-559
- Meißner, W., Ahlers, A. und Seifart, K.H. (1995).** The activity of transcription factor PBP, which binds to the proximal sequence element of mammalian U6 genes, is regulated during differentiation of F9 cells. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 5888-5897
- Meißner, W., Thomae, R. und Seifart, K.H. (2002).** The activity of transcription factor IIIC1 is impaired during differentiation of F9 cells. *J. Biol. Chem.*, **277**, 7148-7156
- Miller, J., McLachlan, A. D. & Klug, A. (1985).** Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO J.*, **4**, 1609-1614
- Mital, R., Kobayashi, R. und Hernandez, N. (1996).** RNA polymerase III transcription from the human U6 and adenovirus type 2 VAI promoters has different requirements for human BRF, a subunit of human TFIIIB. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 7031-7042
- Mittal, V., Cleary, M.A., Herr, W. und Hernandez, N. (1996).** The Oct-1 POU-specific domain can stimulate small nuclear RNA gene transcription by stabilizing the basal transcription complex SNAPc. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 1955-1965
- Mittal, V., Ma, B. und Hernandez, N. (1999).** SNAPc: a core promoter factor with a built-in DNA-binding damper that is deactivated by Oct-1 POU domain. *Genes Dev.*, **13**, 1807-1821
- Moir, R.D., Sethy-Coraci, I., Puglia, K., Librizzi, M.D. und Willis, I.M., (1997).** A tetratricopeptide repeat mutation in yeast transcription factor IIIC131 (TFIIIC131, facilitates recruitment of TFIIIB-related factor TFIIIB70). *Mol. Cell Biol.*, **17**, 7119-7125
- Moir, R.D., Puglia, K. und Willis, I.M. (2000).** Interactions between the tetratricopeptide repeat-containing transcription factor TFIIIC131 and its ligand, TFIIIB70-evidence for a conformational change in the complex. *J. Biol. Chem.*, **275**, 26591-26598
- Moorefield, B. und Roeder, R.G. (1994).** Purification and characterization of human transcription factor IIIA. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20857-20865
- Moss, T. und Stefanovsky, V.Y. (1995).** Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I. *Proc. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.*, **50**, 25-66
- Murphy, S., Moorefield, B. und Pieler, T. (1989).** Common mechanism of promoter recognition by RNA polymerases II and III. *Trends Genet.*, **5**, 122-126

- Murphy, S., Yoon, J.B., Gerster, T. und Roeder, R.G. (1992).** Oct-1 and Oct-2 potentiate functional interactions of a transcription factor with the proximal sequence element of small nuclear RNA genes. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 3247-3261
- Myslinski, E., Krol, A. und Carbon, P. (1998).** ZNF76 and ZNF143 are two human homologs of the transcriptional activator Staf. *J. Biol. Chem.*, **273**, 21998-2006
- Nielsen, J.N., Hallenberg, C., Frederiksen, S., Sorensen, P.D. und Lomholt, B. (1993).** Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by an upstream DNA sequence. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3631-3636
- Nikolov, D.B., Hu, S.H., Lin, J., Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Chua, N.H., Roeder, R.G. und Burley, S.K. (1992).** Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature*, **360**, 40-46
- Nikolov, D.B., Chen, H., Halay, E.D., Hoffmann, A., Roeder, R.G. und Burley, S.K. (1996).** Crystal structure of a human TATA-box binding protein/TATA element complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4862-4867
- Nolte, R.T., Conlin, R.M., Harrison, S.C. und Brown, R.S. (1998).** Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: structure of a six-finger transcription factor TFIIIA complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2938-2943
- Oettel, S., Hartel, F., Kober, I., Iben, S. und Seifart, K.H. (1997).** Human transcription factors IIIC2, IIIC1 and a novel component IIIC0 fulfil different aspects of DNA binding to various pol III genes. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2440-2447
- Oettel, S., Kober, I. und Seifart, K.H. (1998).** The activity binding to the termination region of several pol III genes represents a separate entity and is distinct from a novel component enhancing U6 snRNA transcription. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4324-4331
- Oshima, Y., Okada, N., Tani, T., Iton, Y. und Iton, M. (1981).** Nucleotide sequences of mouse genomic loci including a gene or pseudogene for U6 (4.8S) nuclear RNA. *Nucl. Acids Res.*, **9**, 5145-5158
- Palmer, J.M. und Folk, W.R. (1990).** Unraveling the complexities of transcription by RNA polymerase III. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 300-304
- Parsons, M.C. und Weil, P.A. (1990).** Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor TFIIIC. Polypeptide composition defined with polyclonal antibodies. *J. Biol. Chem.*, **265**, 5095-5103
- Parsons, M.C. und Weil, P.A. (1992).** Cloning of TFC1, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding the 95 kDa subunit of transcription factor TFIIIC. *J. Biol. Chem.*, **267**, 2894-2901
- Paule, M.R. und White, R.J. (2000).** Transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.*, **6**, 1283-1298
- Persinger, J., Sengupta, S.M. und Bartholomew, B. (1999).** Spatial organization of the core region of yeast TFIIIB-DNA complexes. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 5218-5234
- Pieler, T., Oei, S.L., Hamm, J., Engelke, U. und Erdmann, V.A. (1985a).** Functional domains of the *Xenopus laevis* 5S gene promoter. *EMBO J.*, **4**, 3751-3756
- Pieler, T., Appel, B., Oei, S.L., Mentzel, H. und Erdmann, V.A. (1985b).** Point mutational analysis of the *Xenopus laevis* 5S gene promoter. *EMBO J.*, **4**, 1847-1853

- Pieler, T., Hamm, J. und Roeder, R.G. (1987).** The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell*, **48**, 91-100
- Pluta, K., Lefebvre, O., Martin, N.C., Smagowicz, W.J., Stanford, D.R., Ellis, S.R., Hopper, A.K., Sentenac, A. und Boguta, M. (2001).** Maf1p, a negative effector of RNA polymerase III in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 5031-5040
- Pollard, K.J. und Peterson, C.L. (1997).** Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 6212-6222
- Proudfoot, N. (2000).** Connecting transcription to messenger RNA processing. *TIBS*, **25**, 290-293
- Rechsteiner, M. und Rogers, S.W. (1996).** PEST sequences and regulation by proteolysis. *TIBS*, **21**, 267-271
- Reed, R. (2000).** Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **3**, 5-340
- Reeder, R.H. (1992).** Regulation of transcription by RNA-polymerase I. In: Transcriptional regulation (eds.: McKnight, S. L. & Yamamoto, K.R.). *Cold Spring Harbor Press, New York*, 315-348
- Rincon, J.C., Engler, S.K., Hargrove, B.W. und Kunkel, G.R. (1998).** Molecular cloning of a cDNA encoding human SPH-binding factor, a conserved protein that binds to the enhancer-like region of the U6 small nuclear RNA gene promoter. *Nucleic. Acid Res.*, **26**, 4846-4852
- Roberts, S., Colbert, T. und Hahn, S. (1995).** TFIIIC determines RNA polymerase III specificity at the TATA-containing yeast U6 promoter. *Genes Dev.*, **9**, 832-842
- Roeder, R.G. und Rutter, W.J. (1969).** Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature*, **224**, 234-237
- Roeder, R.G. (1976).** Eukaryotic nuclear RNA polymerases. In: "RNA polymerase" (eds.: Losick, R. & Chamberlin, M.) *Cold Spring Harbor Press, New York*, 285-329
- Roeder, R. G. (1996).** The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 327-335
- Rogers, S.W., Wells, R. und Rechsteiner, M. (1996).** Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, **234**, 364-368
- Rosa, M.D., Gottlieb, E., Lerner, M.R. und Steitz, J.A. (1981).** Striking similarities are exhibited by small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 785-796
- Rüth, J., Conesa, C., Dieci, G., Lefebvre, O., Dusterhoft, A., Ottonello, S. und Sentenac, A. (1996).** A suppressor of mutations in the class III transcription system encodes a component of yeast TFIIIB. *Embo J.*, **15**, 1941-1949
- Sadhale, P.P. und Woychik, N.A. (1994).** C25, an essential RNA polymerase III subunit related to the RNA polymerase II subunit RPB7. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 6164-6170
- Sadowski, C.L., Henry, R.W., Lobo, S.M. und Hernandez, N. (1993).** Targeting TBP to a non-TATA box cis-regulatory element: a TBP-containing complex activates transcription from snRNA promoters through the PSE. *Genes Dev.*, **7**, 1535-1548



- Sadowsky, C.L., Henry, R.W., Kobayashi, R. and Hernandez, N. (1996).** The SNAP45 subunit of the small nuclear RNA (snRNA) activating protein complex required for RNA polymerase II and III snRNA gene transcription and interacts with the TATA box binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 4289-4293
- Sakonju, S., Bogenhagen, D.F. und Brown, D.D. (1980).** A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: I. The 5' border of the region. *Cell*, **19**, 13-25
- Sawadago, M. und Sentenac, A. (1990).** RNA polymerase B (II) and general transcription factors. *Ann. Rev. Biochem.*, **59**, 711-754
- Schaub, M., Mysilinski, E., Schuster, C., Krol, A. und Carbon, P. (1997).** Staf, a promiscuous activator for enhanced transcription by RNA polymerases II and III. *EMBO J.*, **16**, 173-181
- Schneider, H.R., Waldschmidt, R., Jahn, D. und Seifart, K.H. (1989).** Purification of human transcription factor IIIC and its binding to the gene for ribosomal 5S RNA. *Nucleic. Acids Res.*, **17**, 5003-5016
- Schramm, L., Pendergrast, P.S., Sun, Y. und Hernandez, N. (2000).** Different human TFIIIB activities direct RNA polymerase III transcription from TATA-containing and TATA-less promoters. *Genes Dev.*, **14**, 2650-2663
- Schramm, L. und Hernandez, N. (2002).** Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev.*, **16**, 2593-2620
- Schröder, O., Bryant, G.O., Geiduschek, E.P., Berk, A.J. und Kassavetis, G.A. (2003).** A common site on TBP for transcription by RNA polymerases II and III. *EMBO J.*, **22**, 5115-5124
- Schultz, P., Marzourki, N., Marck, C., Ruet, A., Oudet, P. und Sentenac, A. (1989).** The two DNA-binding domains of yeast transcription factor  $\tau$  as observed by scanning transmission electron microscopy. *EMBO J.*, **8**, 3815-3824
- Schultz, M.C., Reeder, R.H. und Hahn, S. (1992).** Variants of the TATA-binding protein can distinguish subsets of RNA-polymerase I, II and III promoters. *Cell*, **69**, 697-702
- Schuster, C., Mysilinski, E., Krol, A. und Carbon, P. (1995).** Staf, a novel zinc finger protein that activates the RNA polymerase III promoter of the selenocysteine tRNA gene. *EMBO J.*, **14**, 3777-3787
- Schwartz, L.B., Sklar, V.E., Jaehning, J.A., Weinmann, R. und Roeder, R.G. (1974).** Isolation and partial characterization of the multiple forms of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase in the mouse myeloma, MOPC 315. *J. Biol. Chem.*, **249**, 5889-5897
- Scott, P.H., Cairns, C.A., Sutcliffe, J.E., Alzuherri, H.M., McLees, A., Winter, A.G. und White, R.J. (2001).** Regulation of RNA polymerase III transcription during cell cycle entry. *J. Biol. Chem.*, **276**, 1005-1014
- Segall, J., Matsui, T. & Roeder, R. G. (1980).** Multiple factors are required for the accurate transcription of purified genes by RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.*, **255**, 11986-11991
- Seifart, K.H. und Sekeris, C.E. (1969).** Alpha-amanitin, a specific inhibitor of transcription by mammalian RNA-polymerase. *Z. Naturforsch. B.*, **24**, 1538-1544
- Seifart, K.H., Benecke, B.J. und Juhasz, P.P. (1972).** Multiple RNA-polymerase species from rat-liver tissue: possible existence of a cytoplasmatic enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, **151**, 519-532

- Seifart, K.H., Wang, L., Waldschmidt, R., Jahn, D. und Wingender, E. (1989).** Purification of human transcription factor IIIA and its interaction with a chemically synthesized gene encoding human 5S rRNA. *J. Biol. Chem.*, **264**, 1702-1709
- Sentenac, A., Riva, M., Thuriaux, P., Buhler, J.M., Treich, I., Carles, C., Werner, M., Ruet, A., Huet, J., Mann, C., Chiannilkulchai, N., Stettler, S. und Mariotte, S. (1992).** Yeast RNA polymerase subunits and genes. In: Transcriptional Regulation (Hrsg. S.L. McKnight und K.R. Yamamoto) 27-54, *Cold Spring Harbor Press, New York*
- Sethy, I., Moir, R.D., Librizzi, M. und Willis, I.M. (1995).** *In vitro* evidence for growth regulation of tRNA gene transcription in yeast. A role for transcription factor (TF) IIIB70 and TFIIIC. *J. Biol. Chem.*, **270**, 28463-28470
- Shaaban, S.A., Bobkova, E.V., Chudzik, D.M. und Hall, B.D. (1996).** In vitro analysis of elongation and termination by mutant RNA polymerases with altered termination behavior. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 6468-6476
- Shah, S.M.A., Kumar, A. Geiduschek, E.P. und Kassavetis, G.A. (1999).** Alignment of the B' subunit of RNA Polymerase III Transcription factor IIIB in its promoter complex. *J. Biol. Chem.*, **274**, 28736-28744
- Shapiro, D.J., Sharp, P.A., Wahli, W.W. und Keller, M.J. (1988).** A high-efficiency HeLa cell nuclear transcription extract. *DNA.*, **7**, 47-55
- Sharp, P.A. (1992).** TATA-binding protein is a classless factor. *Cell*, **68**, 819-821
- Shen, Y., Kassavetis, G.A., Bryant, G.O. und Berk, A.J. (1998).** Polymerase (Pol) III TATA box-binding protein (TBP)-associated factor Brf binds to a surface on TBP also required for activated Pol II transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 1692-1700
- Silver, L.M., Martin, G.R. und Strickland, S. (1983).** Teratocarcinoma stem cells. *Cold Spring Harbor Laboratory*
- Simmen, K.A., Waldschmidt, R., Burnes, J., Parry, H.D., Seifart, K.H. und Mattaj, I.W. (1992).** Proximal sequence element factor binding and species specificity in vertebrate U6 snRNA promoters. *J. Mol. Biol.*, **223**, 873-884
- Sinn, E., Wang, Z., Kovelman, R. und Roeder, R.G. (1995).** Cloning and characterization of a TFIIIC2 subunit (TFIIIC beta) whose presence correlates with activation of RNA polymerase III-mediated transcription by adenovirus E1A expression and serum factors. *Genes Dev.*, **9**, 675-685
- Sterner, D.E. und Berger, S.L. (2000).** Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2**, 435-459
- Sterner, D.E., Wang, X., Bloom, M.H., Simon, G.M. und Berger, S.L. (2002).** The SANT Domain of Ada2 Is Required for Normal Acetylation of Histones by the Yeast SAGA Complex. *J. Biol. Chem.*, **10**, 8178-8186
- Stein, T., Crighton, D., Warnock, L.J., Milner, J. und White, R.J. (2002b).** Several regions of p53 are involved in repression of RNA polymerase III transcription. *Oncogene*, **21**, 5540-5547
- Strickland, S. und Mahdavi, V. (1978).** The induction of differentiation in Teratocarcinoma stem cells by Retinoic Acid. *Cell*, **15**, 393-403

- Strickland, S., Smith, K.K. und Marotti, K.R. (1980).** Hormonal induction of differentiation in Teratocarcinoma stem cells: Generation of parietal endoderm by Retinoic Acid and Dibutylryl camp. *Cell*, **21**, 347-355
- Strickland, S. (1981).** Mouse Teratocarcinoma cells: Prospects for the study of embryogenesis and neoplasia. *Cell*, **24**, 277-278
- Sturm, R.A., Das, G. und Herr, W. (1988).** The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes Dev.*, **2**, 1582-1599
- Stünkel, W., Kober, I. und Seifart, K.H. (1997).** A nucleosome positioned in the distal promotor region activates transcription of the human U6 gene. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 4397-4405
- Sutcliffe, J.E., Cairns, C.A., McLees, A., Allison, S.J., Tosh, K. und White, R.J. (1999).** RNA polymerase III transcription factor IIIB is a target for repression by pocket proteins p107 and p130. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4255-4261
- Sutcliffe, J.E., Brown, T.R., Allison, J.S., Scott, P.H. und White, R.J. (2000).** Retinoblastoma protein disrupts interactions required for RNA polymerase III Transcription. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 9192-9202
- Swanson, R.N., Conesa, C., Lefebvre, O., Carles, C., Ruet, A., Quemeneur, E., Gagnon, J. und Sentenac, A. (1991).** Isolation of TFC1, a gene encoding one of two DNA-binding subunits of yeast transcription factor tau (TFIIIC). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4887-4891
- Teichmann, M. und Seifart, K.H. (1995).** Physical separation of two different forms of human TFIIIB active in the transcription of the U6 or the VAI gene in vitro. *Embo J*, **14**, 5974-5983
- Teichmann, M., Dieci, G., Huet, J., R  th, J., Sentenac, A. und Seifart, K.H. (1997).** Functional interchangeability of TFIIIB components from yeast and human cells *in vitro*. *EMBO J.*, **16**, 4708-4716
- Teichmann, M., Wang, Z. und Roeder, R.G. (2000).** A stable complex of a novel transcription factor IIB- related factor, human TFIIIB50, and associated proteins mediate selective transcription by RNA polymerase III of genes with upstream promoter elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14200-14205
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acid Res.*, **22**, 4673-4680
- Thuillier, V., Stettler, S., Sentenac, A., Thuriaux, P. und Werner, M. (1995).** A mutation in the C31 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III affects transcription initiation. *EMBO J.*, **14**, 351-359
- Udvardy, A. und Seifart, K.H. (1976).** Transcription of specific genes in isolated nuclei from HeLa cells in vitro. *Eur. J. Biochem.*, **62**, 353-363
- Upadhyaya, R., Lee, J.H. und Willis, I.M. (2002).** Maf1 is an essential mediator of diverse signals that repress RNA polymerase III transcription. *Mol. Cell*, **10**, 1489-1494
- Vogel, J.L. und Kristie, T.M. (2000).** Autocatalytic proteolysis of the transcription factor-coactivator C1 (HCF): A potential role for proteolytic regulation of coactivator function. *PNAS*, **17**, 9425-9430
- Wagner, S. (2002).** Die Rolle des Polymerase III-Transkriptionsfaktors TFIIIC2 während der Bildung des Initiationskomplexes am VAI-Gen. In *Fachbereich Medizin*. Marburg: Philipps-Universität

- Waldschmidt, R., Jahn, D., Teichmann, M., Jahn, M., Meissner, W. und Seifart, K.H. (1990).** Physical and immunological characterisation of human transcription factor IIIA. *Eur. J. Biochem.*, **194**, 167-176
- Waldschmidt, R., Wanandi, I. und Seifart, K. H. (1991).** Identification of transcription factors required for the expression of mammalian U6 genes in vitro. *Embo J.*, **10**, 2595-2603
- Walter, P. und Blobel, S. (1982).** Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature*, **299**, 691-698
- Wanandi, I., Waldschmidt, R. und Seifart, K.H. (1993).** Mammalian transcription factor PBP. Characterization of its binding properties to the proximal sequence element of U6 genes. *J. Biol. Chem.*, **268**, 6629-6640
- Wang, Z. und Roeder, R.G. (1995).** Structure and function of a human transcription factor TFIIIB subunit that is evolutionarily conserved and contains both TFIIIB- and high-mobility-group protein 2-related domains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 7026-7030
- Wang, Z. und Roeder, R.G. (1996).** TFIIIC1 acts through a downstream region to stabilize TFIIIC2 binding to RNA polymerase III promoters. *Mol Cell Biol* **16**, 6841-6850
- Wang, Z. und Roeder, R.G. (1997).** Three human RNA polymerase III-specific subunits form a subcomplex with a selective function in specific transcription initiation. *Genes Dev*, **11**, 1315-1326
- Wang, Z., Luo, T. und Roeder, R.G. (1997).** Identification of an autonomously initiating RNA polymerase III holoenzyme containing a novel factor that is selectively inactivated during protein synthesis inhibition. *Genes Dev.*, **11**, 2371-2382
- Wang, Z. und Roeder, R.G. (1998).** DNA topoisomerase I and PC4 can interact with human TFIIIC to promote both accurate termination and transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Mol. Cell.*, **1**, 749-757
- Wang, Z., Bai, L., Hsieh, Y.J. und Roeder, R.G. (2000).** Nuclear factor 1 (NF1) affects accurate termination and multiple-round transcription by human RNA polymerase III. *EMBO J.*, **19**, 6823-6832
- Weil, P.A., Segall, J., Harris, B., Ng, S.Y. und Roeder, R.G. (1979).** Faithful transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase III in systems reconstituted with purified DNA templates. *J. Biol. Chem.*, **254**, 6163-6173
- Weinmann, R. und Roeder, R.G. (1974).** Role of DNA-dependent RNA polymerase 3 in the transcription of the tRNA and 5S RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1790-1794
- Werner, M., Hermann-Le Denmat, S., Treich, I., Sentenac, A. und Thuriaux, P. (1992).** Effect of mutations in a zinc binding domain of yeast RNA polymerase C (III) on enzyme function and subunit association. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1087-1095
- Werner, M., Chaussivert, N., Willis, I.M. und Sentenac, A. (1993).** Interaction between a complex of RNA polymerase III subunits and the 70-kDa component of transcription factor IIIB. *J. Biol. Chem.*, **268**, 20721-20724
- Weser, S. (2000).** Analyse einzelner Phasen des RNA Polymerase III Transkriptionszyklus. In *Fachbereich Biologie*. Marburg: Philipps-Universität.
- Weser, S., Riemann, J., Seifart, K.H. und Meißner, W. (2003).** Assembly and isolation of intermediate Steps of transcription complexes formed on the human 5S rRNA gene. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2408-2416

- White, R.J. und Jackson, S.P. (1992a).** The TATA box binding protein: a central role in transcription of by RNA-polymerases I, II and III. *Trends Genet.*, **8**, 284-288
- White, R.J. und Jackson, S.P. (1992b).** Mechanism of TATA-box-binding protein recruitment to a TATA-less class III promoter. *Cell*, **71**, 1041-1053
- White, R.J., Khoo, B.C., Inostroza, J.A., Reinberg, D. und Jackson, S.P. (1994).** Differential regulation of RNA polymerase I, II, and III by the TBP-binding repressor Dr1. *Science*, **266**, 448-450
- Whitehall, S.K., Kassavetis, G.A. und Geiduschek, E.P. (1995).** The symmetry of the yeast U6 RNA gene's TATA box and the orientation of the TATA-binding protein in yeast TFIIIB. *Genes Dev.*, **9**, 2974-2985
- Willis, I.M. (1993).** RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity. *Eur. J. Biochem.* **212**, 1-11
- Willis, I.M. (2002).** A universal nomenclature for subunits of the RNA polymerase III transcription initiation factor TFIIIB. *Genes Dev.*, **16**, 1337-1388
- Wilson, A.C., LaMarco, K., Peterson, M.G. und Herr, W. (1993).** The VP16 accessory protein HCF is a family of polypeptides processed from a large precursor protein. *Cell*, **1**, 115-125
- Wong, M.W., Henry, W.R., Ma, B., Kobayashi, R., Klages, N., Matthias, P., Strubin, M. und Hernandez, N. (1998).** The large subunit of basal transcription factor SNAPc is a Myb domain protein that interacts with Oct-1. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 368-377
- Wysocka, J. und Herr, W. (2003).** The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends Biochem. Sci.*, **6**, 294-304
- Yamamoto, M., Jonas, D. und Seifart, K.H. (1977).** Transcription of ribosomal 5S RNA by RNA polymerase C in isolated chromatin from HeLa cells. *Eur. J. Biochem.*, **80**, 243-253
- Yoon, J.B., Murphy, S., Bai, L., Wang, Z. und Roeder, R.G. (1995).** Proximal sequence element-binding transcription factor (PTF) is a multisubunit complex required for transcription of both RNA polymerase II- and RNA polymerase III-dependent small nuclear RNA genes. *Mol Cell Biol*, **15**, 2019-2027
- Yoon, J.B. und Roeder, R.G. (1996).** Cloning of two proximal sequence element-binding transcription factor subunits that are required for transcription of small nuclear RNA genes by RNA polymerase II and III and interact with the TATA-binding protein. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 1-9
- Yoshinaga, S. K., Boulanger, P. A. und Berk, A. J. (1987).** Resolution of human transcription factor TFIIIC into two functional components. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 3585-3589
- Yoshinaga, S.K., L'Etoile, N.D. und Berk, A.J. (1989).** Purification and characterization of transcription factor IIIC2. *J. Biol. Chem.*, **264**, 10726-10731
- Zhao, X., Schramm, L., Hernandez, N. und Herr, W. (2003).** A shared surface of TBP directs RNA polymerase II and III transcription via association with different TFIIIB family members. *Mol. Cell*, **11**, 151-161

## **9 Anhang**

### **9.1 Akademische Lehrer**

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Aurich, Barth, Beato, Elsässer, Garten, Habermehl, Hartmann, Hasilik, Jungclas, Kern, Kirchner, Knöller, Koolman, Lammel, Löffler, von Löw, Lührmann, Müller, Niessing, Röhm, Schäfer, Schulz, Seifart, J. Seitz, K.A. Seitz, Steinmetz

## 9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin in Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel "Identifizierung des zentralen Polypeptids des generellen RNA-Polymerase III Transkriptionsfaktors TFIIIC1" am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. K.H. Seifart sowie Prof. Dr. R. Lührmann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in dieser Dissertation angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bislang an keinem anderen in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit werden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Stephan Weser, Christin Gruber, Heike M. Hafner, Martin Teichmann, Robert G. Roeder, Klaus H. Seifart, and Wolfgang Meißner (2004)

Transcription Factor-like Nuclear Regulator, the 250 kDa form of Homo sapiens TFIIIB double prime, is an essential component of human TFIIIC1 activity.

(Eingereicht)

Marburg, 26.03.04

### **9.3 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. K.H. Seifart, der mit seinem mir entgegengebrachten Vertrauen diese Arbeit ermöglicht hat und mich zudem in der Endphase unterstützend beraten hat. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Lührmann für die unkomplizierte Übernahme der Doktorvaterschaft am Ende dieser Arbeit.

Bei Wolfgang Meißner und Stephan Weser möchte ich mich für die Betreuung und die außerordentlich humorvollen Unterhaltungen bedanken. Nicht nur während der experimentellen Phase sondern vor allem auch während des Schreibens erwiesen sich Stephans kritische Tipps als sehr wertvoll.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei Ulla Kopiniak, die stets ein offenes Ohr für allerlei Probleme hatte und eine sehr gute Freundin geworden ist. Herzlichen Dank auch an meine (z.T. ehemaligen) Kollegen Sahra Fehl, Heike Hafner, Helen Hoffmeister, Jana Riemann, Frauke Seifart und Sabine Wagner für die Kooperativität und gute Stimmung im Labor.



## 9.4 Lebenslauf

### Christin Gruber

Geb. am 06.11.1976 in Freital

#### Schulbildung

1983 – 1991	7. Polytechnische Oberschule in Ilmenau
1991 – 1995	Goethe Gymnasium in Ilmenau
Mai 1995	Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

#### Hochschulausbildung

10/1995 – 10/2000	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität in Marburg (Hauptstudium mit den Schwerpunkten Molekularbiologie, Biochemie und Immunologie)
10/1999 – 10/2000	Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr. Dr. K.H. Seifart am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg mit dem Thema: „Untersuchungen zur Funktion und Zusammensetzung der humanen Pol III-Transkriptionsfaktoren TFIIIB $\alpha$ und TFIIIU“
01/2001 – 03/2004	Promotionsarbeit unter Leitung von Prof. Dr. Dr. K.H. Seifart sowie Prof. Dr. R. Lührmann am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg mit dem Thema: „Identifizierung des zentralen Polypeptids des generellen RNA-Polymerase III Transkriptionsfaktors TFIIIC1“

Marburg, 26.03.04